

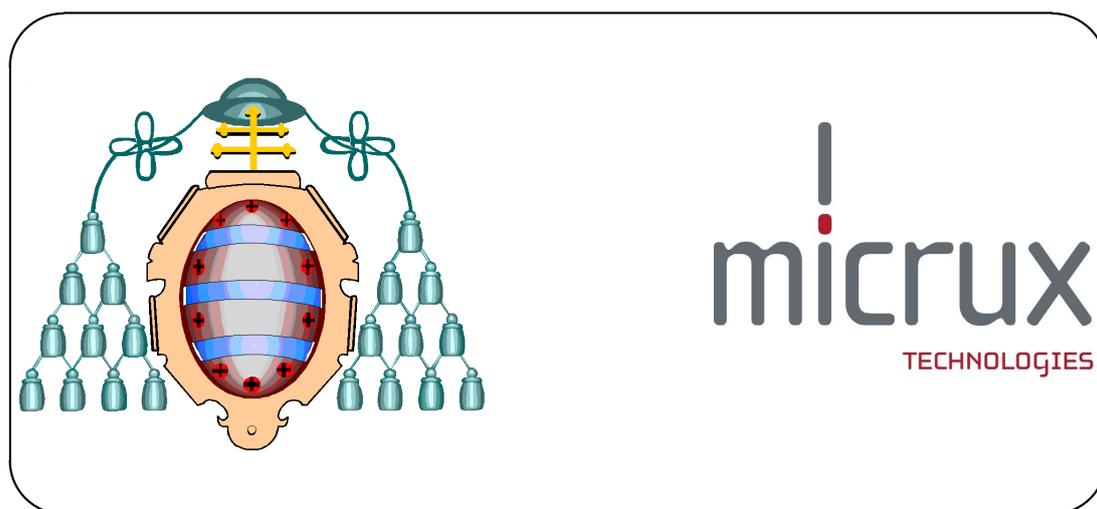
MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y
BIOANALÍTICAS

Desarrollo de microchips de electroforesis capilar con detección electroquímica para el análisis de muestras biológicas

Trabajo Fin de Máster

Sergio Fernández Poza

15 de julio de 2013



Universidad de Oviedo

Facultad de Química

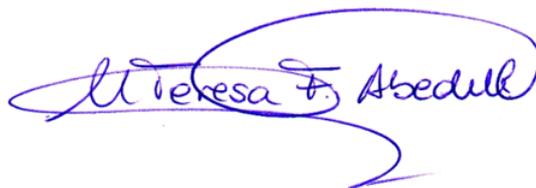
Departamento de Química Física y Analítica - MicruX Fluidic

Directores

Dr. Mario Castaño Álvarez

Handwritten signature of Mario Castaño Álvarez in blue ink. The signature is stylized, with the first name 'Mario' written in a large, cursive font and the last name 'Castaño' written below it in a smaller, more legible font.

Dra. María Teresa Fernández Abedul

Handwritten signature of María Teresa Fernández Abedul in blue ink. The signature is written in a cursive style, with the first name 'María' and the last name 'Abedul' being the most prominent parts.

Fecha de defensa

24 de julio de 2013

A mis padres, a mi hermana y a Lore

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Miniaturización en Química Analítica	1
1.1.1. Microfluídica	2
1.2. Electroforesis capilar	2
1.2.1. De la electroforesis convencional a la CE	3
1.2.2. Movilidad electroforética	4
1.2.3. Movilidad electroosmótica	4
1.2.4. Aspectos instrumentales y operacionales en electroforesis capilar	6
1.2.4.1. Introducción de la muestra	6
1.2.4.2. Capilar	8
1.2.4.3. Detección	8
1.2.5. Parámetros analíticos	10
1.3. Microchips de electroforesis (ME)	12
1.3.1. Fabricación de MEs	13
1.3.1.1. Fabricación de microchips de vidrio	13
1.3.1.2. Fabricación de microchips poliméricos	14
1.3.2. Modos de inyección	15
1.3.3. Detección electroquímica	16
1.3.3.1. Detección amperométrica	16
1.3.3.2. Modos de detección	17
1.4. Aplicaciones analíticas	18
1.4.1. Analitos estudiados	18
2. Experimental	21
2.1. Objetivos	21
2.2. Reactivos	21
2.3. Instrumentación	22
2.3.1. Sistema portátil de electroforesis	22
2.4. MEs con detección electroquímica	22
2.4.1. Electroodos	23
2.4.2. Diseños de MEs empleados	23
2.4.2.1. Diseño 1	24
2.4.2.2. Diseño 2	24
2.4.2.3. Diseño 3	25
2.5. Procedimientos experimentales	25
2.5.1. Preparación de los patrones	25
2.5.2. Preparación de las disoluciones de trabajo	25

2.5.3. Protocolo de trabajo	26
2.5.3.1. Acondicionamiento de los microcanales	26
2.5.3.2. Montaje del sistema	26
3. Resultados y discusión	29
3.1. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 1	29
3.1.1. Potencial de detección	29
3.1.2. Voltaje de separación	30
3.1.3. Voltaje de inyección	31
3.1.4. Tiempo de inyección	32
3.1.5. Precisión	33
3.1.6. Calibrado	34
3.2. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 2	35
3.2.1. Voltaje de separación	35
3.2.2. Voltaje de inyección	35
3.2.3. Tiempo de inyección	36
3.2.4. Precisión	37
3.2.5. Calibrado	38
3.3. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 3	39
3.3.1. Voltaje de separación	39
3.3.2. Potencial de inyección	39
3.3.3. Tiempo de inyección	40
3.3.4. Precisión	41
3.3.5. Calibrado	41
4. Conclusiones	43
A. Apéndice	45
A.1. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 1	45
A.2. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 2	47
A.3. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 3	48
Bibliografía	51

1. Introducción

1.1. Miniaturización en Química Analítica

La Química Analítica moderna ha experimentado un desarrollo muy importante durante los últimos años y por ello, trabaja en nuevos campos que antes parecían completamente independientes. La capacidad de realizar operaciones de laboratorio a pequeña escala supone un gran reto en que cada vez se avanza más, ya que aporta varias ventajas, como conseguir tiempos de análisis más cortos y emplear menores cantidades de muestra y de reactivos, lo que supone generar una menor cantidad de residuos y aproximarse cada vez más a la denominada “Química Verde”.

Los sistemas de microanálisis total (μ TAS, *micro-total analysis systems*), también denominados sistemas *lab-on-a-chip* pretenden incorporar todos los pasos del proceso analítico en un solo dispositivo tal y como se esquematiza en la Figura 1.1, lo que sugiere cambiar la idea del laboratorio de Química Analítica concebida hasta ahora.



Figura 1.1.: Esquema del concepto *lab-on-a-chip*.

Sin embargo, para miniaturizar el proceso analítico tradicional hay que considerar que los fenómenos estudiados en escala macroscópica no siguen las mismas leyes ni los mismo principios que si estos mismos transcurren en la micro o nanoescala. Por ello, uno de los frentes de estudio más importantes en la actualidad se basa en implementar posibles vías para trasladar métodos

de análisis a una escala mucho más pequeña obteniendo resultados iguales o mejores que en escala macroscópica.

Debido a que una de las etapas más importantes del proceso analítico es la referente a la separación, la CE fue una de las primeras técnicas integradas en los primeros diseños de μ TAS. La miniaturización de los sistemas de CE tradicionales supone una reducción considerable en los tiempos de análisis, consiguiendo una gran eficiencia durante el proceso de separación. La fabricación de microcanales sobre diferentes tipos de soportes empleando materiales que permitan, en función de su composición, el movimiento de un fluido mediante fenómenos electrocinéticos y generar en su interior un flujo electroosmótico hacen posible el desarrollo de dispositivos de CE completamente miniaturizados.

1.1.1. Microfluídica

La microfluídica trata con el flujo de fluidos en pequeña escala (normalmente en el rango del μm), siendo el volumen total contenido en estos sistemas del orden del fL/nL. Este tipo de sistemas sigue los mismos principios que la mecánica clásica de fluidos, pero la relación superficie/volumen es mucho mayor que en los sistemas de grandes dimensiones, lo que favorece fenómenos de superficie a considerar, como los de adsorción. En los sistemas microfluídicos, el flujo viene determinado por la densidad del fluido (ρ), su viscosidad (η), el diámetro del canal (d) y su velocidad lineal (v), todos ellos relacionados entre sí a través del número de Reynolds (Re).

$$Re = \frac{\rho dv}{\eta} \quad (1.1)$$

Para $Re > 2300$ se trata de un régimen turbulento y para $Re < 2000$ se trata de un régimen laminar. En los sistemas microfluídicos, la interacción fluido-superficie tiene una gran relevancia, ya que define la magnitud de las fuerzas que intervienen en el interior del canal (F_{can}). Los dos parámetros que ayudan a definir esta interacción son la tensión superficial del fluido (γ) y el ángulo de contacto (Θ).

$$F_{can} = 2\pi r \gamma \cdot \cos \Theta \quad (1.2)$$

Donde r es el radio del microcanal.

1.2. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica de separación que se ha desarrollado gracias a los avances conseguidos en la cromatografía de líquidos de alta resolución en combinación con las técnicas más tradicionales de electroforesis. La electroforesis capilar presenta una gran relevancia en el análisis de biomoléculas, donde las técnicas cromatográficas se muestran menos eficaces, así

como en la separación de compuestos de pequeña masa molecular, difíciles de separar mediante los soportes electroforéticos clásicos.

Desde las últimas décadas, la electroforesis capilar de alta resolución (CE o HPCE) se ha impuesto sobre las técnicas electroforéticas convencionales en el ámbito de la Química Analítica, contribuyendo al avance de la Medicina y de la Genética con la automatización de la secuenciación de ADN y el análisis de compuestos biológicos de gran importancia.

1.2.1. De la electroforesis convencional a la CE

La separación mediante electroforesis se basa en la migración sobre un soporte de compuestos cargados ante la aplicación de un campo eléctrico. Sin embargo, la separación en disolución está muy limitada por fenómenos de difusión térmica y de convección, por lo que tradicionalmente se han utilizado soportes sólidos, como acetato de celulosa o geles de poliacrilamida y agarosa. En electroforesis capilar, la separación se consigue en capilares de sílice fundida con un diámetro interno de 25 a 75 μm y con una longitud de 20 a 80cm, sumergidos en depósitos cargados con buffer entre los que se aplica una diferencia de potencial elevada a través de dos electrodos, tal y como se muestra en la Figura 1.2.

La diferencia de potencial aplicada puede llegar a $600\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$, asumiendo una intensidad de corriente máxima de 100mA para la separación. Debido a que los capilares se comportan como medios anticonvectivos, la electroforesis capilar puede trabajar en disolución. El sistema de detección se encuentra al final del capilar, junto al compartimento catódico.

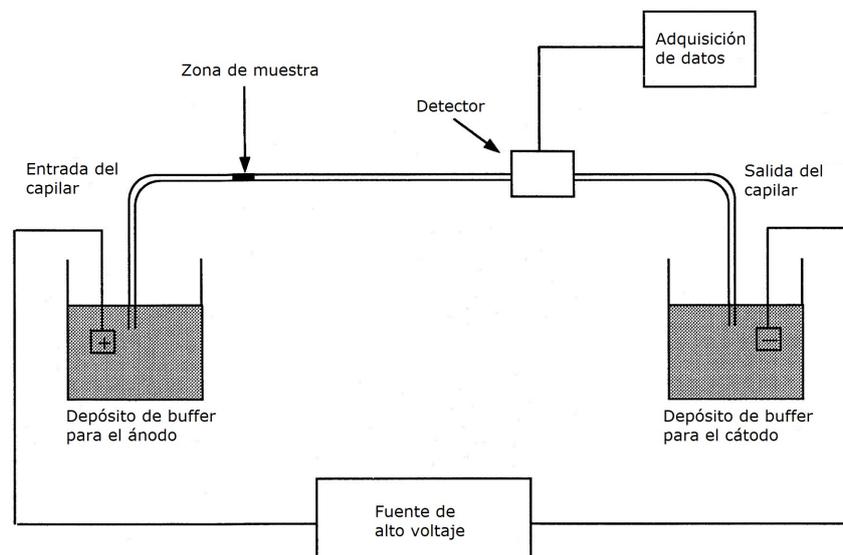


Figura 1.2.: Diagrama de un equipo de electroforesis capilar.

1.2.2. Movilidad electroforética

En un determinado medio, la velocidad de migración de un ion (v) es directamente proporcional al campo eléctrico aplicado (\vec{E}):

$$v = \mu_e \cdot \vec{E} \quad (1.3)$$

Donde μ_e es la constante de proporcionalidad, denominada movilidad electroforética, la cual depende de la naturaleza del ion y del medio en el que se encuentra. Se trata de una constante física determinada en condiciones de dilución infinita para ese ion.

Cuando un ion se somete a un campo eléctrico, experimenta dos fuerzas contrapuestas: la fuerza eléctrica (F_E), que se relaciona con el campo eléctrico aplicado (\vec{E}) mediante la carga relativa del ion (q) y la fuerza de fricción (F_F), que depende del radio hidrodinámico del ion (r), de su velocidad (v) y de la viscosidad del medio (η).

$$F_E = q \cdot \vec{E} \quad F_F = -6\pi\eta r v \quad (1.4)$$

El balance de las dos fuerzas define la movilidad del ion, siendo mayor cuanto menor sea su tamaño y mayor sea su carga.

$$q \cdot \vec{E} = 6\pi r \eta v \implies \mu_e = \frac{q}{6\pi \eta r} \quad (1.5)$$

A pesar de que la movilidad electroforética se considera como una constante física, esta depende estrictamente de la fuerza iónica y del pH del medio donde se desarrolla el proceso.

1.2.3. Movilidad electroosmótica

Se trata del flujo debido a la constitución de una doble capa eléctrica de las especies en disolución sobre las cargas presentes en la superficie de la pared del capilar como consecuencia de la diferencia de potencial aplicada, tal y como se indica en la Figura 1.3.

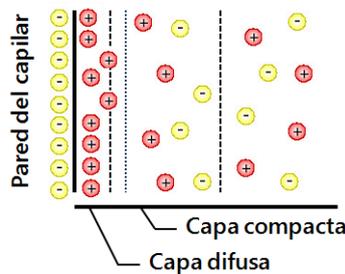


Figura 1.3.: Doble capa generada en la pared del capilar.

Las superficies sólidas adquieren un exceso de carga neta negativa como consecuencia de procesos de ionización, adsorción o ambos. Debido a que las paredes del capilar se componen de sílice fundida, los grupos silanol (SiOH) se encuentran ionizados por encima de un valor de pH de 4,0 (SiO⁻), permitiendo que el flujo electroosmótico en el interior del capilar empiece a ser significativo, tal y como se indica en la Figura 1.4.

De esta forma, los cationes se sitúan en las inmediaciones de las cargas negativas sobre la superficie del capilar, generando una diferencia de potencial conocida como potencial Z. Los cationes que se encuentran en la capa difusa se encuentran solvatados por el agua, y al aplicar una diferencia de potencial entre los dos electrodos, se mueven hacia el cátodo arrastrando al resto de compuestos (tanto aniónicos como neutros).

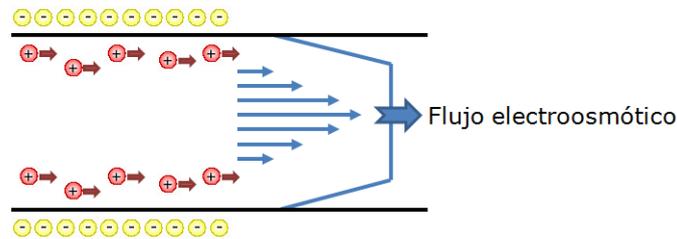


Figura 1.4.: Flujo electroosmótico como consecuencia de las cargas negativas de los grupos silanol desprotonados sobre la superficie del capilar.

En condiciones normales, el flujo electroosmótico se dispone desde el ánodo hacia el cátodo. Los cationes presentan un tiempo de migración menor que los compuestos neutros (que solo se mueven por el efecto del flujo electroosmótico) y estos, a su vez, menor que los aniónicos (el flujo electroosmótico se contrapone al flujo electroforético, ya que estos migran de forma natural hacia el ánodo).

La velocidad (v_{EOF}) es directamente proporcional al campo eléctrico aplicado (\vec{E}):

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot \vec{E} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \cdot \vec{E} \quad (1.6)$$

Donde μ_{EOF} es la movilidad electroosmótica, ζ es el potencial Z generado sobre las paredes del capilar y ε y η son la constante dieléctrica y la viscosidad del medio, respectivamente. La movilidad electroosmótica depende del potencial Z generado, el cual varía con la cantidad de cargas negativas presentes en la superficie del capilar.

De esta forma, el pH determina la movilidad electroosmótica de un determinado ion, ya que a valores altos, los grupos silanoles se encuentran predominantemente desprotonados y el número de cargas negativas sobre la pared del capilar es mayor. La movilidad electroosmótica también depende de la fuerza iónica del medio, ya que a valores altos se produce una compresión de la doble capa y, por lo tanto, disminuye el potencial Z.

El flujo electroosmótico también puede variar con la modificación de las paredes del capilar (recubrimientos, aditivos...). Estos pueden variar, e incluso invertir la carga neta sobre la superficie del capilar y por lo tanto, modificar completamente la naturaleza del flujo electroosmótico.

1.2.4. Aspectos instrumentales y operacionales en electroforesis capilar

Para conseguir la mayor eficiencia posible en las separaciones por CE, es necesario optimizar diferentes parámetros instrumentales, tales como la introducción de la muestra, el propio capilar y su acondicionamiento y el sistema de detección. En la Figura 1.5 se muestra un esquema de un equipo convencional de CE.

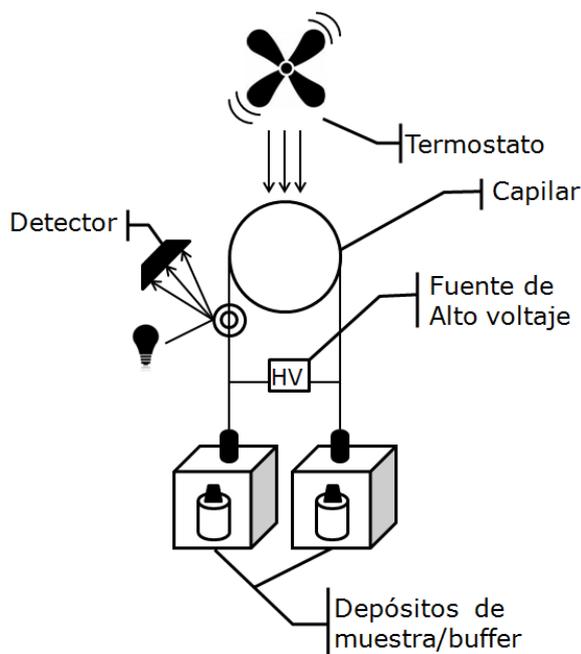


Figura 1.5.: Esquema instrumental de un equipo de CE.

1.2.4.1. Introducción de la muestra

En CE se trabaja con pequeños volúmenes de muestra proporcionales al volumen interno de capilar, ya que de esta forma se consigue una separación más eficiente. La zona de inyección del capilar presenta una longitud muy pequeña (unos pocos milímetros), ya que si se utilizan zonas de inyección muy grandes la anchura de los picos aumenta y su forma puede distorsionarse como consecuencia de la heterogeneidad del campo eléctrico. Los modos de inyección pueden clasificarse en hidrodinámicos y electrocinéticos.

Inyección hidrodinámica Consiste en la introducción de la muestra en el capilar aplicando presión en el depósito que la contiene, vacío en el extremo contrario del capilar o variando la altura relativa de ambos depósitos, tal y como se indica en la Figura 1.6. En este último caso, la presión generada es directamente proporcional a la densidad del buffer utilizado (ρ) y a la diferencia de altura entre los depósitos (Δh).

$$\Delta P = 9,8\rho \cdot \Delta h \quad (1.7)$$

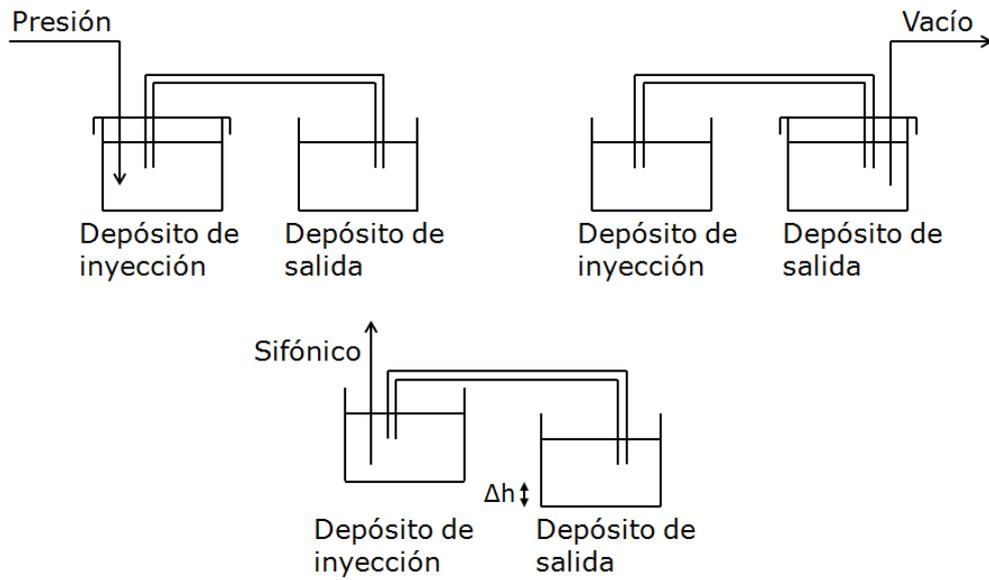


Figura 1.6.: Modos de inyección hidrodinámica.

El volumen de muestra introducido viene dado por:

$$V = \frac{\Delta P \cdot d^4 \cdot \pi t}{128\eta L} \quad (1.8)$$

Donde ΔP es la presión generada, t es el tiempo durante el que se aplica, d es el diámetro interno del capilar, η es la viscosidad de la disolución del buffer y L es la longitud total del capilar.

Inyección electrocinética Ambos depósitos contienen la muestra, y aplicando una diferencia de potencial entre ellos la muestra entra en el capilar por migración y por la presión ejercida por el flujo electroosmótico, tal y como se indica en la Figura 1.7.

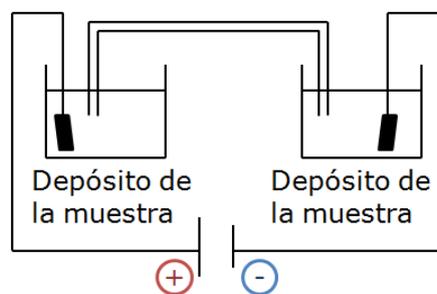


Figura 1.7.: Inyección electrocinética.

La cantidad de analito introducida (Q) viene dada por:

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF}) V \pi C t \cdot r^2}{L} \quad (1.9)$$

Donde V es el potencial aplicado entre ambos extremos del capilar, r es su radio interno, L es su longitud total, C es la concentración y t es el tiempo durante el que se aplica el potencial.

1.2.4.2. Capilar

Los capilares utilizados en CE se fabrican en sílice fundida debido a que es un material inerte, flexible, transparente a la radiación UV (para detectores basados en la absorción de radiación UV-visible) y barato. Los capilares se recubren con una capa de poliimida, lo que les permite doblarse y ser manipulados sin romperse. Los más frecuentemente utilizados presentan un diámetro interno de 10 a 200 μm y un diámetro externo de 350 a 400 μm , además de una longitud total de 50 a 75 cm, como el que se muestra en la Figura 1.8.



Figura 1.8.: Capilar de CE (modelo $\mu\text{SIL}-\text{WAX}$ de Agilent).

Para conseguir reproducibilidad, es necesario un acondicionamiento del capilar muy exhaustivo. La primera etapa consiste en retirar posibles especies adsorbidas y desprotonar los grupos silanol a base de lavados con disoluciones de hidróxido sódico en distinta concentración. A continuación, se realiza un lavado con el buffer seleccionado para generar el flujo electroosmótico en el interior del capilar. Muchos buffers pueden verse involucrados en procesos de adsorción sobre el capilar, como los de fosfato.

Otro factor a tener en cuenta para el acondicionamiento del capilar es la temperatura, ya que de ella depende la viscosidad de la disolución del buffer. Por ello es necesario que el compartimento que contiene el capilar se encuentre termostatzado.

1.2.4.3. Detección

Se han desarrollado multitud de detectores para CE, siendo algunos de ellos comunes a las técnicas cromatográficas. Muchos de ellos son amperométricos, conductimétricos o fluorimétricos, aunque los más ampliamente utilizados son los basados en absorción de radiación UV-visible.

Detección UV–visible Se trata de un sistema de detección relativamente universal, ya que son muchos los analitos los que absorben radiación en este rango del espectro (380nm–780nm). El sistema se encuentra integrado en el capilar, eliminando parte del recubrimiento de poliimida que lo recubre (*on column*) junto al compartimento catódico. La sensibilidad se encuentra limitada por el pequeño diámetro del capilar, por lo que la fuente de radiación debe encontrarse muy bien enfocada, evitando que llegue luz dispersada al monocromador. Para compensar esta deficiencia, se utilizan varios diseños de la celda de detección, basados en la focalización de la radiación y en el aumento de la longitud del paso óptico, como se indica en la Figura 1.9.

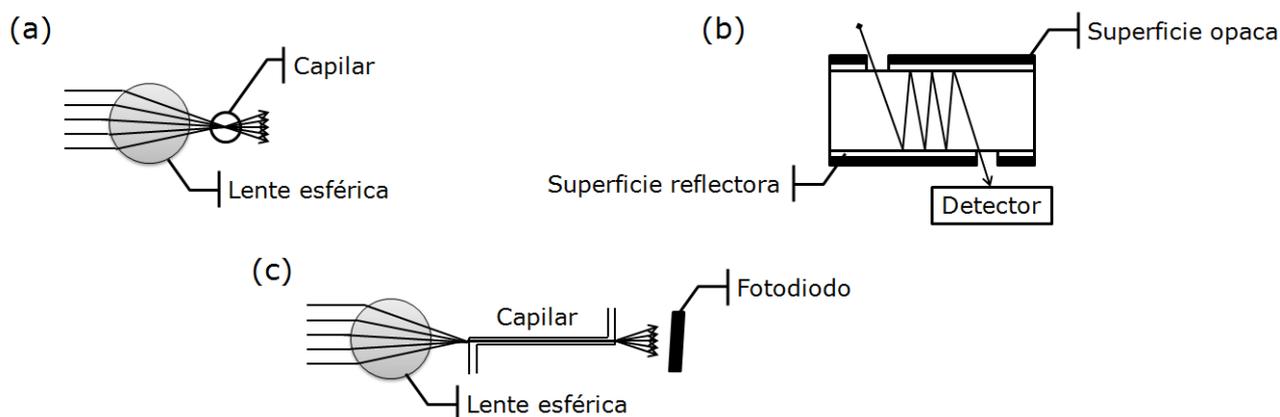


Figura 1.9.: Modificaciones de la geometría y diseño del capilar y de la celda de detección para mejorar la sensibilidad: (a) Lente esférica que concentra la radiación en la ventana de detección, (b) celda de reflexión múltiple de la radiación, (c) celda en forma de Z.

Detección electroquímica Supone una manera de evitar la falta de sensibilidad conseguida en la detección espectrofotométrica, debido a que no depende del diámetro interno del capilar. Además, las celdas de detección electroquímica son más baratas que las ópticas, ya que requieren de una instrumentación mucho más sencilla.

La detección electroquímica (ED) está basada en las propiedades electroquímicas del analito siguiendo los principios de conductimetría, potenciometría, amperometría o voltametría.

- **Detección potenciométrica.** Se basa en el transporte de un analito cargado a través de una membrana, generando una diferencia de potencial entre ambos lados debido a la diferencia de carga generada durante el transporte. Este tipo de detección presenta dos problemas fundamentales: la dificultad de fabricar membranas de un tamaño ajustable al diámetro interno del capilar y la respuesta por parte de las membranas convencionales a iones metálicos, lo que excluye a compuestos de otra naturaleza.
- **Detección conductimétrica.** Se basa en la medida de un cambio en la conductividad de un fluido sometido a un campo eléctrico aplicado entre dos electrodos. Se trata de un sistema de detección universal, ya que cualquier analito cargado genera un cambio en la conductividad, pero al mismo tiempo tiene como inconveniente la dependencia directa de la señal con el volumen de la celda de detección, y por lo tanto del diámetro interno del

capilar. Por este motivo, este tipo de detección no presenta ventajas frente a la detección espectrofotométrica.

- Detección amperométrica.** Se basa en la medida de la intensidad de corriente resultante en un proceso electroquímico de oxidación o de reducción de un compuesto sobre la superficie de un electrodo como consecuencia de aplicar un potencial constante entre este y otro electrodo de referencia en un medio conductor. Este tipo de detección presenta selectividad respecto a sustancias que presenten o no electroactividad, y dentro de estas, entre las que experimentan una reacción electroquímica a potenciales lo suficientemente diferentes. En la Figura 1.10 se muestra un esquema de detección amperométrica en un equipo convencional de CE.

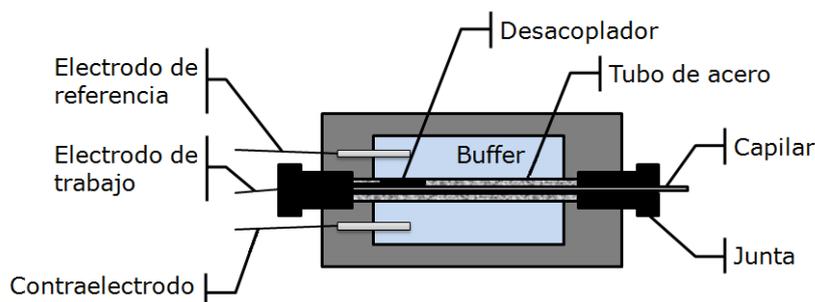


Figura 1.10.: Esquema de una celda de detección electroquímica integrada en un equipo de CE.

Los dos problemas fundamentales que presenta esta técnica son la necesidad de aislar la celda de detección de los voltajes utilizados para el proceso de separación y conseguir un perfecto alineamiento entre el capilar y el electrodo de trabajo.

Para aislar la celda electroquímica del voltaje de separación se utiliza un desacoplador, que suele ser un material conductor situado a 2cm del final del capilar.

1.2.5. Parámetros analíticos

La mayoría de los parámetros analíticos en CE son comunes a los utilizados en las técnicas cromatográficas.

Calentamiento del capilar Al aplicar una diferencia de potencial elevada entre los extremos de un capilar con una disolución conductora en su interior, se produce un calentamiento por efecto Joule. El aumento de la temperatura en el interior del capilar afecta a las movilidades de los compuestos, y por lo tanto a los picos obtenidos en el electroferograma, por lo que debe ser estrictamente controlado. El calentamiento en el capilar viene dado por:

$$\Delta T = \frac{Q \cdot r_1^2}{2} \cdot \left[\frac{1}{k_1} \ln \left(\frac{r_2}{r_1} \right) + \frac{1}{k_2} \ln \left(\frac{r_3}{r_2} \right) + \frac{1}{h \cdot r_3} \right] \quad (1.10)$$

Donde Q es el calor generado por efecto Joule, k_1 y k_2 son las conductividades térmicas de la sílice y de la poliimida ($k_1 > k_2$), r_1 , r_2 y r_3 son los radios interno y externo del capilar y de la poliimida, respectivamente y h es la velocidad de transferencia térmica desde el interior hacia el exterior del capilar.

Eficacia Cuando un analito se separa en el capilar, su perfil de concentración se ensancha como se representa en la Figura 1.11.

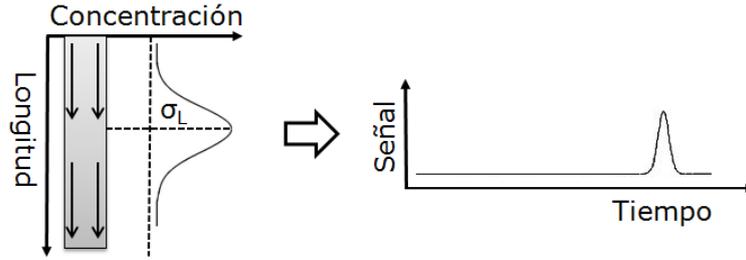


Figura 1.11.: Dispersión del soluto en el capilar y traslación al electroferograma.

Esta dispersión lineal vendrá dada por la varianza, σ_L^2 .

$$\sigma_L^2 = H \cdot L \quad H = \frac{L}{N} \quad (1.11)$$

Donde H es la altura equivalente a un plato teórico y L es la longitud total de la columna. El número de platos teóricos, N , se calcula a partir de la varianza en un valor discreto de tiempo.

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2} \quad (1.12)$$

En condiciones ideales, la dispersión experimentada por un analito a lo largo del capilar viene dada únicamente por la difusión longitudinal.

$$\sigma_L^2 = 2Dt = \frac{2D \cdot L_{ef} \cdot L_T}{V(\mu_e + \mu_{EOF})} \Rightarrow N = \frac{V \cdot L_{ef} \cdot (\mu_e + \mu_{EOF})}{2D \cdot L_T} = \frac{\vec{E} \cdot L_{ef} \cdot (\mu_e + \mu_{EOF})}{2D} \quad (1.13)$$

Donde D es el coeficiente de difusión de la sustancia, L_{ef} es la longitud efectiva del capilar, L_T es la longitud total del capilar, V es el voltaje aplicado y μ_e y μ_{EOF} son las movibilidades electroforética y electrosmótica, respectivamente¹.

¹ $\vec{E} = \frac{V}{L_T}$.

La eficacia puede calcularse de forma experimental a partir del tiempo de migración de un compuesto (t_M) y las anchuras de pico en la semialtura ($\omega_{1/2}$) y en la línea de base (ω).

$$N = 16 \cdot \frac{t_M^2}{\omega^2} = 5,54 \cdot \frac{t_M^2}{\omega_{1/2}^2} \quad (1.14)$$

Resolución Es el parámetro que define cuándo la separación entre dos componentes es buena.

$$R = \frac{2(t_{M,2} - t_{M,1})}{\omega_1 + \omega_2} = \frac{t_{M,2} - t_{M,1}}{4 \cdot \sigma_L} \quad (1.15)$$

Donde $t_{M,1}$ y $t_{M,2}$ son los tiempos de migración de los compuestos 1 y 2, respectivamente, ω es la anchura del pico en su base y σ_L es la varianza temporal. En CE, la resolución está condicionada por la eficacia, y no por la selectividad como sucede en cromatografía.

$$R = \frac{\Delta\mu_e}{4 \cdot \bar{\mu}_e} \cdot \sqrt{N} \quad \Delta\mu_e = \mu_{e,2} - \mu_{e,1} \quad \bar{\mu}_e = \frac{\mu_{e,2} + \mu_{e,1}}{2} \quad (1.16)$$

Donde $\mu_{e,1}$ y $\mu_{e,2}$ son las movilidades electroforéticas de los compuestos 1 y 2, respectivamente. Sustituyendo la expresión 1.7 en la expresión anterior:

$$R = \frac{\Delta\mu_e}{4\sqrt{2}} \cdot \left(\frac{V}{D(\bar{\mu}_e + \mu_{EOF})} \right)^{1/2} \quad (1.17)$$

La resolución no aumenta linealmente con el voltaje aplicado, como sucede con la eficacia.

1.3. Microchips de electroforesis (ME)

Los MEs (*microchips electrophoresis*) son el resultado de la miniaturización de los equipos de electroforesis capilar, con los que comparten muchas características analíticas e instrumentales.

El diseño general de los MEs consiste en dos canales de diferente longitud en forma de cruz grabados sobre un soporte. El canal más pequeño es utilizado para la inyección de la muestra y el canal más largo, para la separación de los compuestos que contiene, tal y como se indica en la Figura 1.12.

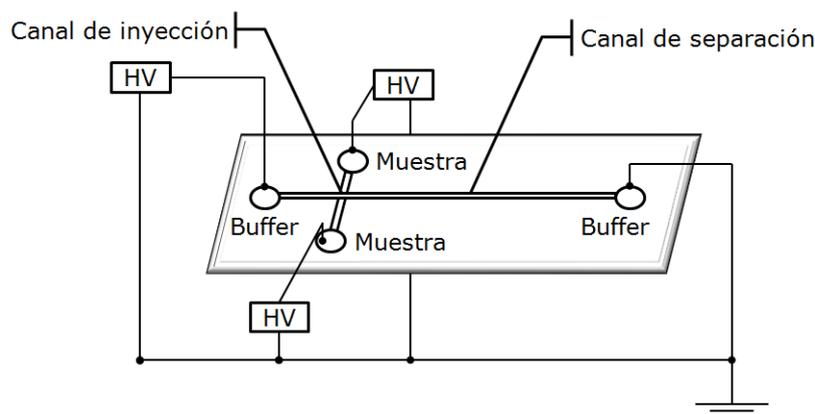


Figura 1.12.: Esquema de un ME.

1.3.1. Fabricación de MEs

Para la fabricación de MEs se pueden emplear diversos materiales, entre los que se encuentran el vidrio, polímeros termoplásticos, como el PMMA (polimetilmetacrilato) o elastómeros, como el PDMS (polidimetilsiloxano). Todos ellos deben presentar buenas propiedades ópticas, resistencia química, capacidad de generar un buen flujo electroosmótico y posibilidad de trabajar en condiciones de voltajes muy elevados.

1.3.1.1. Fabricación de microchips de vidrio

Se emplean obleas de vidrio como sustrato y se modifican empleando técnicas fotolitográficas, tal y como se indica en la Figura 1.13. En primer lugar, se deposita sobre el vidrio una capa sacrificial (de Cr, Al...). Sobre esta capa sacrificial posteriormente se deposita una resina fotosensible que se hace soluble (positiva) o insoluble (negativa) al ser sometida a radiación en una disolución reveladora. A continuación, se interpone una máscara entre la fuente de radiación y la resina, de forma que solo se disuelven las zonas de la resina que quedan expuestas a la luz². Con un tratamiento adecuado, la capa sacrificial es retirada del sustrato únicamente en las zonas donde se ha disuelto la resina.

Una vez definidos los microcanales, es necesario horadarlos en el vidrio empleando los reactivos adecuados, entre los que destaca el HF. A continuación, se retiran los restos de resina y de capa sacrificial que quedan, se perforan los orificios que actuarán como depósitos y se sellan los microcanales superponiendo sobre el sustrato otra oblea de vidrio.

²Las resinas positivas son las más ampliamente utilizadas.

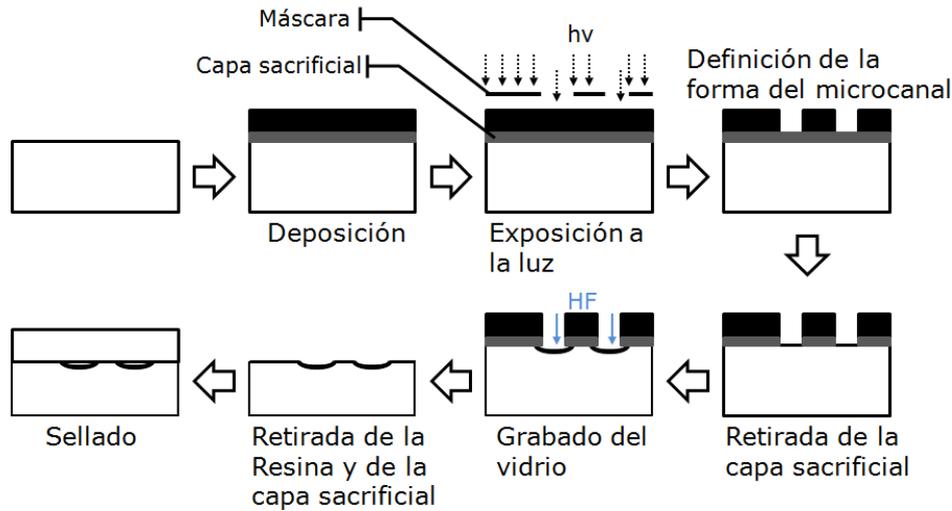


Figura 1.13.: Proceso de fabricación de ME en un sustrato de vidrio.

1.3.1.2. Fabricación de microchips poliméricos

Los métodos de fabricación descritos para microchips poliméricos pueden ser por moldeo o por fabricación directa.

Métodos de moldeo Implican una primera etapa de fabricación del molde que se desea utilizar y una segunda etapa de traslación de los microcanales al material polimérico empleado como sustrato. Dentro de los métodos por moldeo se describen tres tipos diferentes.

- **Grabado en caliente.** Se construye un molde con las estructuras que se desean transferir al sustrato y se presiona sobre este cuando ha sido previamente precalentado hasta su temperatura de transición vítrea (T_g). De esta forma, el sustrato adopta la forma del molde al enfriarse por debajo de su temperatura de transición vítrea.
- **Moldeo por inyección.** Se construye un molde con las estructuras que se desean transferir al sustrato y después de calentarse, se inyecta sobre este el material polimérico fundido. Posteriormente, el molde se enfría y el polímero se retira cuando solidifica.
- **Moldeo por curado.** Se construye un molde con las estructuras que se desean transferir al sustrato y se inyecta sobre este una mezcla que contiene los componentes necesarios para que el proceso de polimerización transcurra de forma normal. Después de un tiempo a presión y temperatura controladas, el sustrato polimeriza y se retira del molde.

Métodos directos de fabricación Consisten en la eliminación del material polimérico en todas aquellas zonas donde se desea modificar la estructura del sustrato, empleando técnicas de ablación láser o micromecanizado.

1.3.2. Modos de inyección

Al igual que en los equipos de CE, los modos de inyección electrocinética en sistemas de ME tienen una importancia fundamental, ya que es necesario introducir en los microcanales volúmenes de muestra muy pequeños (pL-nL) de forma reproducible. En estos sistemas, el cruce de los dos canales funciona como un inyector integrado, el cual puede ser ortogonal o de doble T, como se indica en la Figura 1.14.



Figura 1.14.: Tipos de inyectores en ME.

Los modos de inyección electrocinéticos descritos para ME son *unpinched*, *pinched* y *gated*.

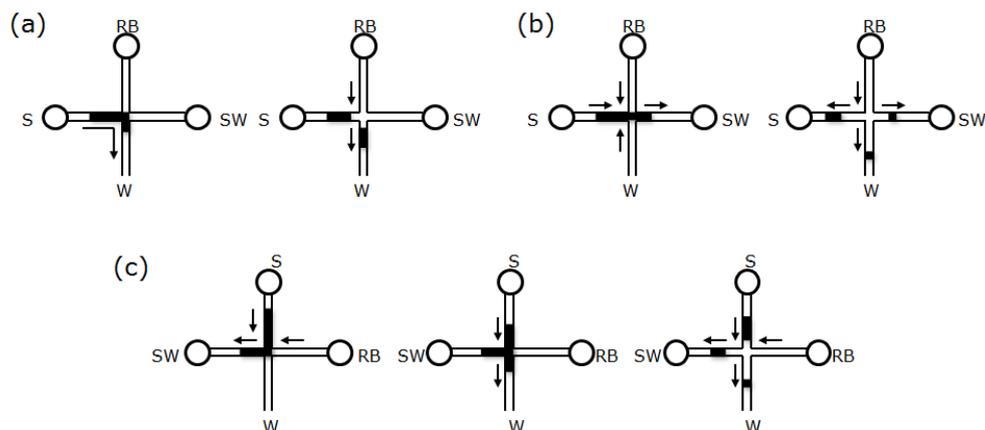


Figura 1.15.: Modos de inyección electrocinética: (a) *unpinched*, (b) *pinched* y (c) *gated*. Los depósitos que aparecen son el del buffer (RB), el de muestra (S), el de desecho de muestra (SW) y el de detección (W).

Unpinched Se aplica un voltaje entre el depósito de muestra y el depósito de detección conectado a tierra, de tal forma que la muestra se introduce en el canal de separación por inyección electrocinética. Después de la inyección, se aplica un voltaje de separación entre el depósito que contiene el buffer y el depósito de detección, permitiendo así la separación de la muestra a lo largo del canal. Este es el modo de inyección más utilizado, y presenta como ventaja que únicamente es necesaria una sola fuente de alto voltaje.

Pinched La muestra se introduce electrocinéticamente desde su depósito hasta el depósito de desecho de muestra (etapa de carga). Todos los depósitos se encuentran conectados a una fuente de alto voltaje diferente, de tal forma que se aplican potenciales al depósito del buffer y al depósito de detección para que haya un flujo continuo hasta la intersección de los dos canales para evitar la entrada precipitada de muestra en el canal de separación. A continuación, se aplican potenciales en los depósitos de muestra y desecho de muestra para crear un flujo continuo hasta ellos, y un potencial entre los depósitos del buffer y el de detección para separar la muestra que ya haya pasado al canal de separación.

Gated Al igual que el modo *pinched*, también requiere que el voltaje en cada depósito este controlado de forma independiente por distintas fuentes, y trabaja con el depósito de detección conectado a tierra para dirigir el flujo electroosmótico hacia él. Aplicando distintos programas de potencial de distinta magnitud entre los cuatro depósitos, se consigue separar únicamente una pequeña fracción de la muestra inyectada electrocinéticamente.

1.3.3. Detección electroquímica

La sencillez y la elevada sensibilidad que ofrecen los métodos electroquímicos han ayudado a implementar este tipo de detección en los sistemas de ME. Sin embargo, los elevados voltajes aplicados durante el proceso de separación pueden interferir en el proceso de detección, lo que hace necesario un buen aislamiento eléctrico entre ambos procesos.

1.3.3.1. Detección amperométrica

La detección electroquímica en sistemas de MEs se lleva a cabo siguiendo los mismos principios que en CE (subsección 1.2.4.3). Sin embargo, la detección amperométrica tiene una especial relevancia en estos sistemas.

La amperometría se basa en la aplicación de un potencial controlado y constante entre un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo para favorecer una reacción electroquímica sobre este, midiendo la intensidad de corriente que pasa entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, empleando un sistema como el esquematizado en la Figura 1.16.

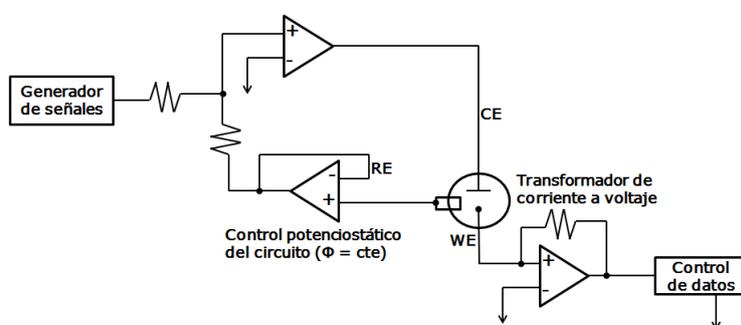


Figura 1.16.: Diagrama de un sistema amperométrico. Los elementos que aparecen son el electrodo de trabajo (WE), el electrodo de referencia (RE) y el contraelectrodo (CE).

1.3.3.2. Modos de detección

Los modos de detección se clasifican en función de la posición que ocupa la celda de detección a lo largo del canal de separación, considerándose tres posibilidades indicadas en la Figura 1.17: *end-channel*, *in-channel* y *off-channel*.

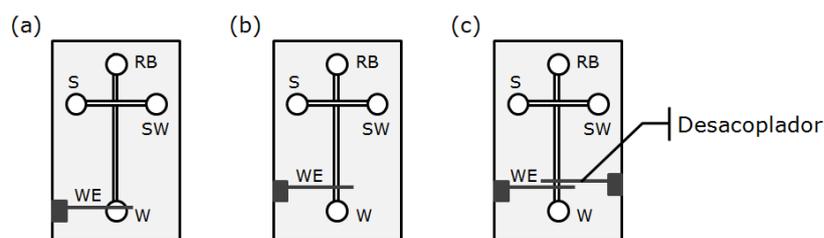


Figura 1.17.: Modos de detección electroquímica en sistemas de ME. (a) *end-channel*, (b) *in-channel* y (c) *off-channel*. Los elementos que aparecen son el depósito del buffer (RB), el depósito de muestra (S), el depósito de desecho de muestra (SW), el depósito de detección (W) y el electrodo de trabajo (WE).

Detección *end-channel* Supone la situación del electrodo de trabajo en el extremo del canal de separación. Esta posibilidad es especialmente útil para evitar que el voltaje de separación interfiera sobre el voltaje de detección, debido a que el campo eléctrico generado durante el proceso de separación disminuye a medida que se avanza en el canal. Sin embargo, la distancia entre el detector y el final del canal de separación puede dar lugar a una pérdida de sensibilidad y de eficacia en la separación.

Detección *in-channel* Supone la situación del electrodo de trabajo en el interior del canal de separación. Los problemas de sensibilidad y de eficacia durante la separación que se observan en la detección *end-channel* ya no presentan importancia aquí, pero es necesario utilizar un potencióstato correctamente aislado para evitar que el voltaje de separación interfiera en el voltaje de detección.

Detección *off-channel* Se trata de un modo de detección que supera las dificultades presentadas por los dos modos anteriores, ya que a pesar de incorporar el electrodo de trabajo directamente sobre el canal de separación, el voltaje de detección no se encuentra interferido por el voltaje de separación gracias al uso de un desacoplador, que desvía el voltaje de separación a tierra en las inmediaciones de la celda electroquímica.

1.4. Aplicaciones analíticas

De forma general, la miniaturización de sistemas analíticos lleva implícita una pérdida de selectividad y sensibilidad. Sin embargo, la miniaturización de los equipos convencionales de CE supone la reducción del tiempo de análisis y la posibilidad de integración de múltiples análisis en un mismo microchip, reduciendo costes y facilitando su uso para cualquier operario.

El principal inconveniente de estos dispositivos es la integración de la etapa de tratamiento de muestra. No obstante, en líneas generales los MEs suponen el principal ejemplo de los sistemas *lab-on-a-chip*, siendo posible tratar matrices cada vez más complejas y resolver problemas analíticos a un menor coste y utilizando cantidades mucho más pequeñas de reactivos y muestras.

1.4.1. Analitos estudiados

En este proyecto se utiliza el ácido úrico y cuatro compuestos similares a este: acetaminofeno, epinefrina, *p*-aminofenol y ácido ascórbico. Las propiedades ácido - base y redox de estos compuestos se muestran en las Figuras de la 1.18 a la 1.22.

Ácido úrico (UA) Pertenece a la familia de las purinas. Se trata de un producto de desecho del metabolismo animal, y su acumulación puede causar problemas de gota y cálculos renales.

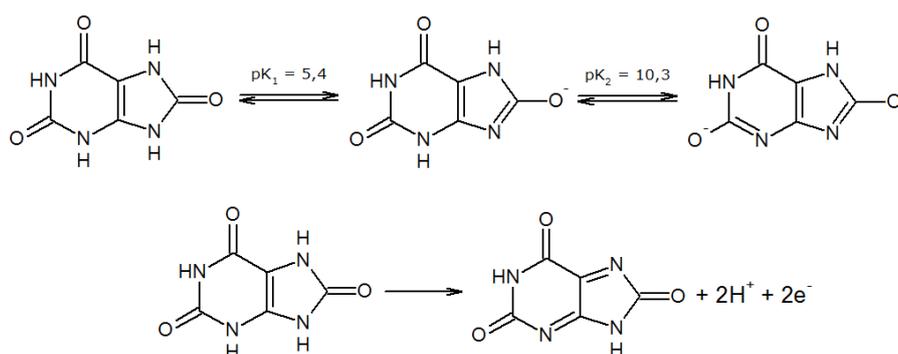


Figura 1.18.: Ácido úrico: comportamiento ácido - base (arriba) y redox (abajo).

Acetaminofeno (APAP) Pertenece a la familia de las amidas aromáticas, y se utiliza como fármaco por sus propiedades analgésicas.

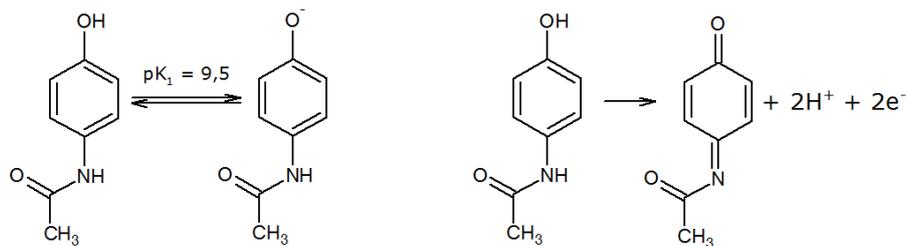


Figura 1.19.: Acetaminofeno: comportamiento ácido - base (izquierda) y redox (derecha).

Epinefrina (EP) Pertenece a la familia de las catecolaminas, y se sintetiza a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina en las glándulas suprarrenales. Se trata de una hormona que aumenta el ritmo cardíaco, la presión sanguínea y la concentración de glucosa en sangre.

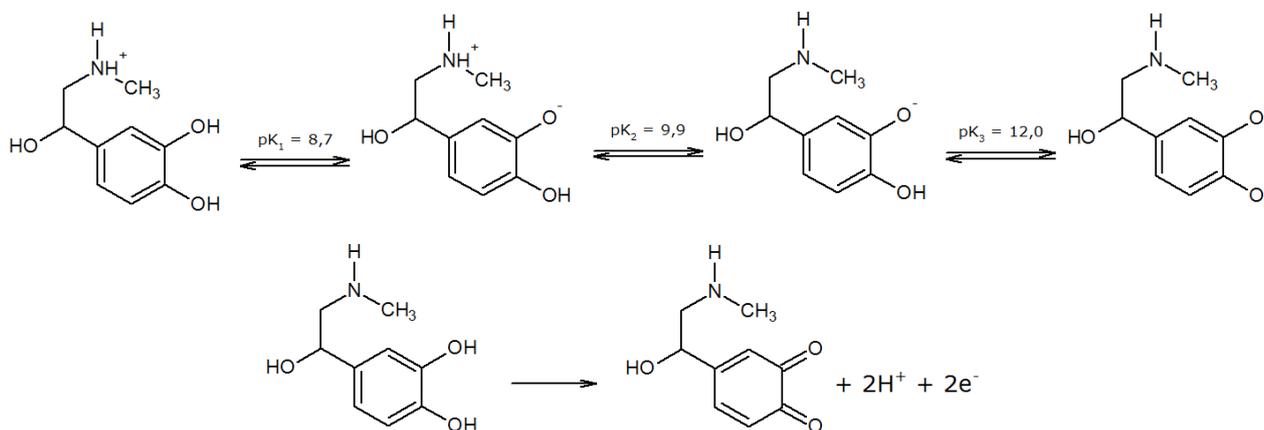


Figura 1.20.: Epinefrina: comportamiento ácido - base (arriba) y redox (abajo).

***p*-aminofenol (pAP)** Pertenece a la familia de los aminofenoles aromáticos. Se utiliza como revelador de fotografía en blanco y negro y es uno de los productos de degradación del acetaminofeno.

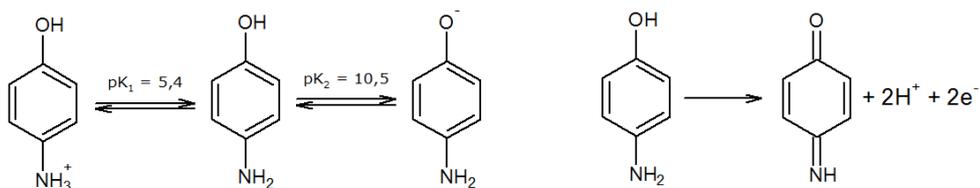


Figura 1.21.: *p*-aminofenol: comportamiento ácido - base (izquierda) y redox (derecha).

Ácido ascórbico (AA) Pertenece a la familia de los endioles cíclicos. Se trata de un ácido orgánico con propiedades antioxidantes, debido a la fácil oxidación de los hidroxilos endiólicos. El enantiómero L es conocido popularmente como vitamina C.

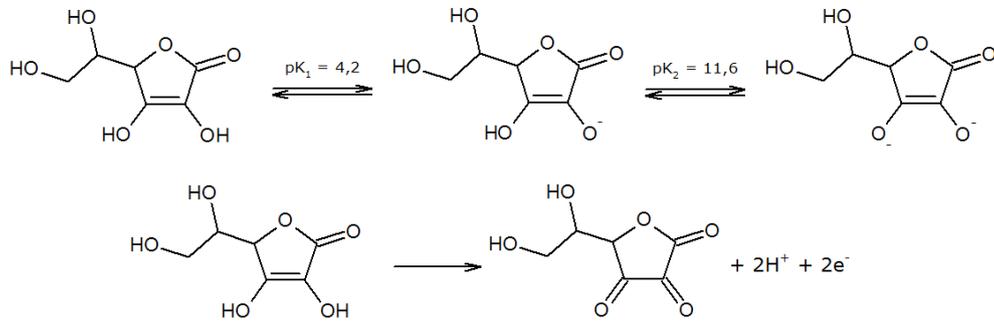


Figura 1.22.: Ácido ascórbico: comportamiento ácido - base (arriba) y redox (abajo).

2. Experimental

2.1. Objetivos

En el presente trabajo se pretende evaluar el comportamiento de diferentes diseños de ME fabricados con resina SU-8 y vidrio pírex, mediante la optimización de diferentes parámetros instrumentales. Con ello, se pretende averiguar si la miniaturización de estos sistemas tiene consecuencias directas sobre sus propiedades analíticas.

2.2. Reactivos

Los compuestos acetaminofeno, epinefrina, *p*-aminofenol, ácido úrico y ácido ascórbico fueron adquiridos en Sigma Aldrich (USA). El ácido clorhídrico fue suministrado por Panreac (Barcelona, España). El hidróxido sódico fue suministrado por Sigma Aldrich (USA). El buffer (MES¹) fue suministrado por MicruX Fluidic (Asturias, España). Para la preparación de todas las disoluciones se utilizó agua ultra pura obtenida a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Merck), representado en la Figura 2.1.



Figura 2.1.: Sistema destilador de agua *Merck Millipore* (300M Ω).

¹Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato.

2.3. Instrumentación

2.3.1. Sistema portátil de electroforesis

Se empleó el modelo HVStat suministrado por MicruX Fluidic, representado en la Figura 2.2. Se trata de un equipo portátil de dimensiones $165\text{mm} \times 150\text{mm} \times 85\text{mm}$ que combina una fuente de alto voltaje y un sistema bipotenciostático para conseguir una detección amperométrica dual. La fuente de alto voltaje trabaja en un rango de potenciales de $\pm 3000\text{V}$, alcanzando una intensidad máxima de $0,34\text{mA}$. El sistema bipotenciostático trabaja en un rango de potenciales de $\pm 2,00\text{V}$, alcanzando una intensidad máxima de $2\mu\text{A}$. El tiempo de adquisición de datos está comprendido entre 10 y 1000ms .²



Figura 2.2.: Sistema portátil HVStat, *MicruX Fluidic*.

2.4. MEs con detección electroquímica

El diseño de los MEs empleados en este trabajo se esquematiza en la Figura 2.3.

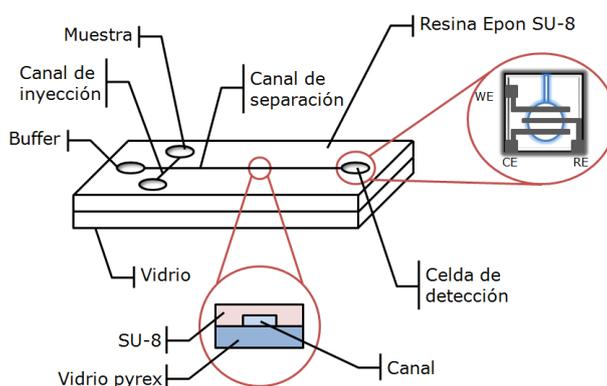


Figura 2.3.: Diseño de un ME con detección electroquímica.

²Durante todos los experimentos, se utilizó un tiempo de adquisición de 50ms .

Los MEs constan de un cuerpo de vidrio pírex y de una cubierta de resina EPON SU-8. En el cuerpo de SU-8 se encuentran cuatro depósitos de 2mm de diámetro para introducir la muestra y el buffer. En el depósito de desecho, se encuentra integrada la celda de detección. Se obtienen canales rectangulares de 50 μ m de anchura y 20 μ m de profundidad.

Se emplearon tres diseños diferentes de ME con canales de distintas longitudes y configuraciones, tal y como se muestra en la Figura 2.4.

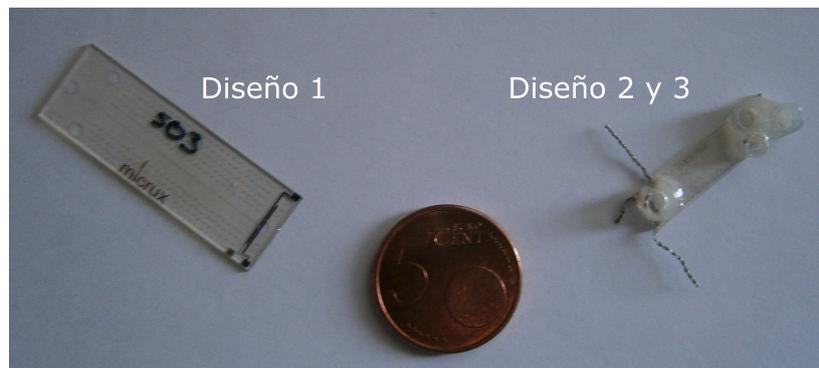


Figura 2.4.: Diferentes diseños empleados de ME.

2.4.1. Electrodo

Se utilizó un sistema convencional de tres electrodos de platino integrados en el microchip en una configuración *end-channel*, tal y como se indica en la Figura 2.5.

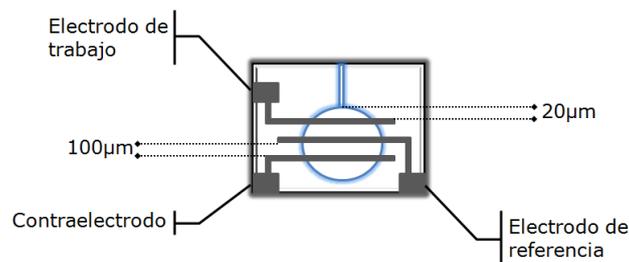


Figura 2.5.: Sistema de tres electrodos en configuración *end-channel*. Dimensiones: WE = 50 μ ×150 μ m, CE = RE = 250 μ m×150 μ m.

2.4.2. Diseños de MEs empleados

Todos los MEs empleados presentan un espesor de la cubierta de resina SU-8 de 0,1mm y un espesor del cuerpo de pírex de 0,65mm.

2.4.2.1. Diseño 1

Se trata de un microchip de dimensiones externas de $38\text{mm} \times 13\text{mm} \times 0,75\text{mm}$. Presenta un diseño de cruz sencilla, tal y como se muestra en la Figura 2.6, con un canal de separación de una longitud total de 35mm y un canal de inyección de 10mm , el cual es dividido en dos partes iguales por el canal de separación, dejando por consiguiente una longitud de 5mm desde el depósito de la muestra hasta el canal de separación.

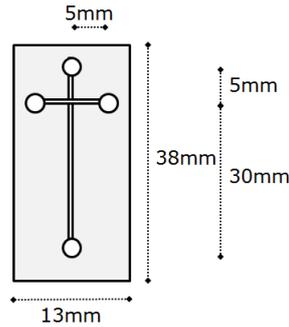


Figura 2.6.: Dimensiones del diseño 1.

2.4.2.2. Diseño 2

Se trata de un microchip de dimensiones externas de $24\text{mm} \times 6\text{mm} \times 0,75\text{mm}$. Presenta un diseño de cruz sencilla, tal y como se muestra en la Figura 2.7, con un canal de separación de una longitud total de 18mm y un canal de inyección de 6mm , el cual es dividido en dos partes diferentes: una de 2mm y otra con un codo de 4mm .

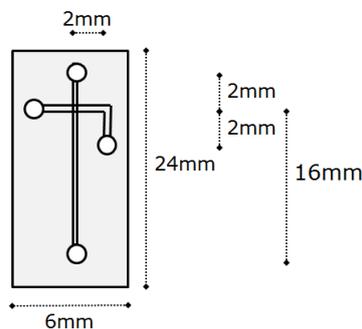


Figura 2.7.: Dimensiones del diseño 2.

2.4.2.3. Diseño 3

Se trata de un microchip de dimensiones externas de $24\text{mm} \times 6\text{mm} \times 0,75\text{mm}$. Presenta un diseño de doble T, tal y como se muestra en la Figura 2.8, con una longitud total de 18mm ($15,9\text{mm} + 0,1\text{mm} + 2\text{mm}$) y un canal de inyección de 6mm , el cual es dividido en dos partes diferentes y separadas entre sí: una de 2mm y otra con un codo de 4mm . La mayor diferencia con los diseños anteriores se basa en el gap de inyección de $0,1\text{mm}$ en el canal de separación.

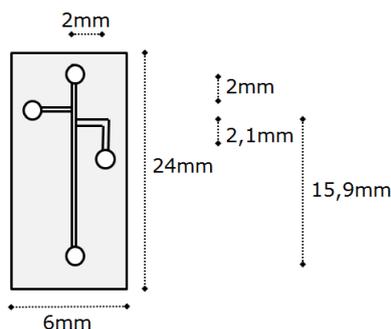


Figura 2.8.: Dimensiones del diseño 3.

2.5. Procedimientos experimentales

2.5.1. Preparación de los patrones

Las disoluciones de acetaminofeno (10mM), epinefrina (10mM) y *p*-aminofenol (10mM) se prepararon en ácido clorhídrico 10mM . La disolución de ácido úrico (10mM) se preparó en hidróxido sódico 20mM y la disolución de ácido ascórbico (10mM) se preparó en agua ultra pura. Las disoluciones de acetaminofeno, epinefrina, *p*-aminofenol y ácido ascórbico se almacenaron en nevera y la de ácido úrico se almacenó a temperatura ambiente.

2.5.2. Preparación de las disoluciones de trabajo

Las disoluciones de acetaminofeno ($200\mu\text{M}$), epinefrina ($100\mu\text{M}$), *p*-aminofenol ($100\mu\text{M}$), ácido úrico ($250\mu\text{M}$) y ácido ascórbico ($500\mu\text{M}$) se prepararon a partir de la dilución de los patrones anteriores utilizando el buffer de separación.

La disolución mezcla de todos los compuestos en las concentraciones anteriores se preparó a partir de los patrones y su posterior dilución con el buffer de separación.

2.5.3. Protocolo de trabajo

2.5.3.1. Acondicionamiento de los microcanales

El acondicionamiento del microchip se realizó al principio de ser utilizado y después de un determinado número de experimentos (dependiendo del diseño utilizado). La primera etapa del acondicionamiento de los microcanales consiste en el lavado con hidróxido sódico 0,1M. Para ello, se llenan tres de los cuatro depósitos con esta disolución y se hace vacío con un trompa de agua en el depósito restante. Este proceso se repite varias veces en todos los depósitos durante 30 minutos.

A continuación, se realizaron dos etapas de lavado de 20 minutos cada una utilizando el mismo procedimiento con agua y buffer de separación, respectivamente.

2.5.3.2. Montaje del sistema

ME Diseño 1 Se empleó un holder como plataforma microfluídica para el microchip, tal y como se muestra en la Figura 2.9. Se trata de un soporte de metacrilato de dos partes de dimensiones 100mm×65mm×15mm con cuatro depósitos integrados que conectan directamente con las salidas del microchip. El sistema se encuentra completamente sellado debido a la presencia de juntas tóricas entre el microchip y la plataforma.

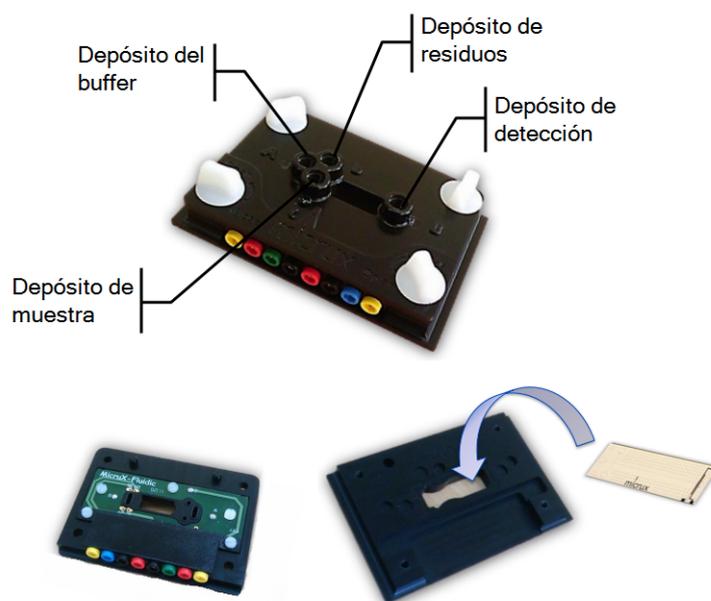


Figura 2.9.: Holder de ME, *MicruX Fluidic*.

El holder dispone de 8 conexiones eléctricas: cuatro de ellas para la detección y las cuatro restantes para la fuente de alto voltaje, tal y como se indica en la Figura 2.10.

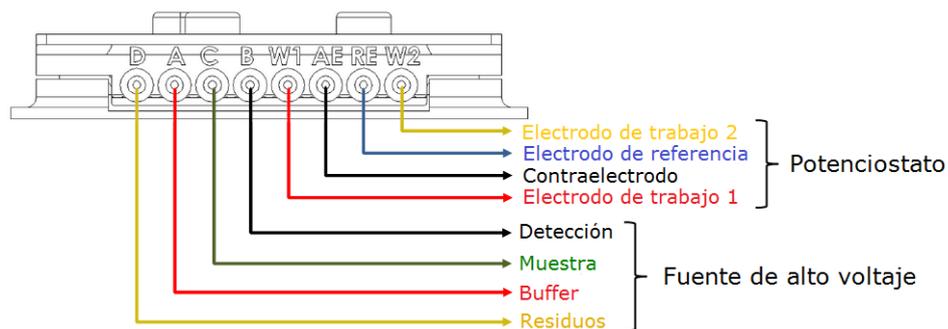


Figura 2.10.: Conexiones eléctricas en el dorsal del holder.

Al aplicar potenciales elevados en la celda de detección, se generan burbujas de oxígeno como consecuencia de la oxidación del disolvente sobre el electrodo de trabajo. Para evitar esto, el electrodo de separación situado en el depósito de detección se utiliza como tierra al mismo tiempo que como contraelectrodo de detección, debido a que su área es mucho mayor.

MEs Diseños 2 y 3 Los electrodos de detección se soldaron a filamentos de cobre empleando una resina epoxi de plata, que se conectaron posteriormente al potenciostato del HVStat. Como electrodos de separación se utilizaron cuatro filamentos de platino sumergidos en los cuatro depósitos del microchip y conectados directamente a la fuente de alto voltaje del HVStat. Al igual que en el diseño 1, también se utiliza el electrodo de separación del depósito de detección como contraelectrodo de detección. Los depósitos de muestra y buffer consisten en puntas de micropipeta de 25 μ L de volumen total, pegados con pegamento de contacto a la superficie del ME.

3. Resultados y discusión

3.1. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 1

3.1.1. Potencial de detección

Para llevar a cabo la detección amperométrica, es necesario aplicar un potencial constante entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. Como consecuencia, se produce la oxidación electroquímica de los analitos sobre la superficie del electrodo. La intensidad de corriente que pasa a través del contraelectrodo depende directamente de la concentración, por lo que se registra como señal analítica.

Se obtienen electroferogramas de la disolución mezcla de los cinco analitos estudiados (Subsección 2.4.2) utilizando utilizando distintos potenciales de detección en la celda. Estos se muestran en la Figura 3.1.

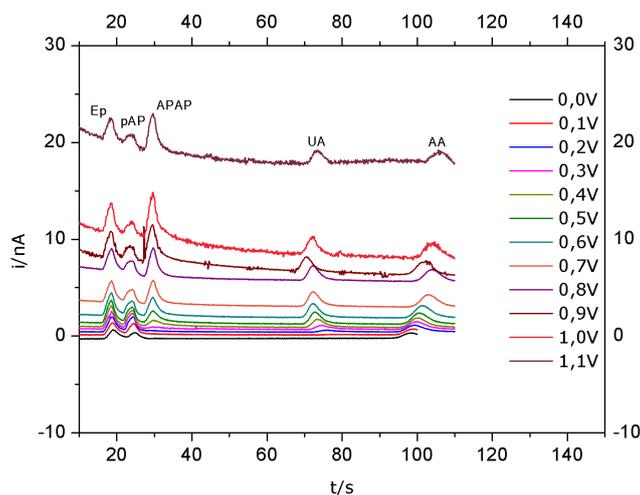


Figura 3.1.: Electroferogramas de la disolución mezcla obtenidos a distintos valores de V_{det} (desde 0V hasta 1,1V) empleando las siguientes condiciones instrumentales: $V_{iny} = +750V$; $V_{sep} = +1000V$ y $t_{iny} = 6s$.

Las intensidades de corriente de cada uno de los analitos en los electroferogramas obtenidos se utiliza para construir curvas hidrodinámicas $i - E$. A partir de estas, se puede obtener el potencial al cual se alcanza la máxima intensidad de corriente para cada uno de los analitos estudiados.

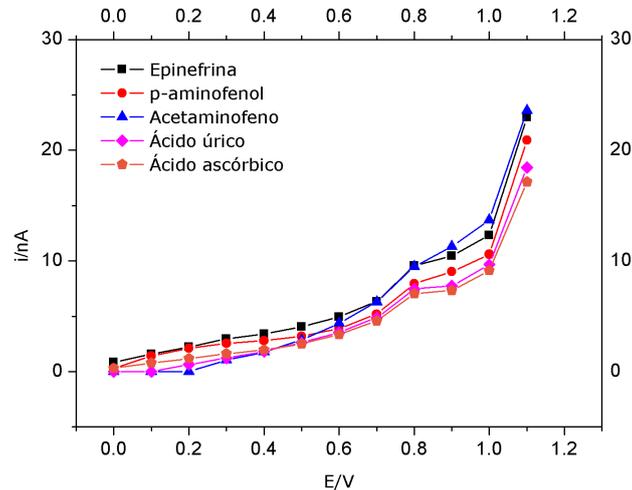


Figura 3.2.: Curvas hidrodinámicas de todos los analitos en la disolución mezcla empleando las mismas condiciones que en la Figura 3.1.

Como se puede apreciar en la Figura 3.2, el potencial al cual se consigue una intensidad de corriente máxima de oxidación de los cinco analitos estudiados es de +0,8V. Debido a que se utiliza la misma celda de detección en todos los microchips utilizados, se puede utilizar en todos los sistemas el mismo potencial de detección¹

3.1.2. Voltaje de separación

Los tiempos de migración de los analitos dependen directamente del voltaje de separación aplicado, ya que valores muy elevados de este parámetro darán lugar a tiempos de migración cortos. Sin embargo, valores elevados pueden suponer una pérdida de resolución entre dos picos que se encuentren próximos entre sí en el electroferograma.

La optimización del voltaje de separación supone encontrar un compromiso entre un tiempo de análisis corto, máxima resolución de todos los picos y la menor interferencia posible con el potencial de detección. En la Figura 3.3 se muestran los electroferogramas obtenidos de la disolución mezcla utilizando diferentes voltajes de separación.

¹Manteniendo un voltaje de separación adecuado para evitar interferencias.

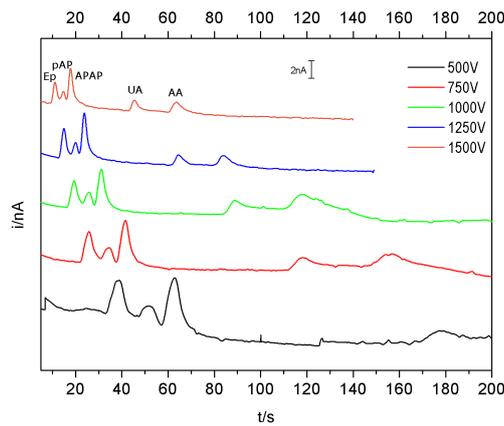


Figura 3.3.: Optimización de V_{sep} (+500V, +750V, +1000V, +1250V y +1500V) empleando las siguientes condiciones instrumentales: $V_{iny} = +750V$; $t_{iny} = 6s$; $V_{det} = +0,8V$; $N = 4$.

Las resoluciones de los picos, calculadas empleando la Ecuación 1.15, se muestran en el Cuadro A.1 del Apéndice. Como se puede apreciar, utilizando un voltaje de separación de +1250V se consigue una buena resolución para casi todos los picos, a excepción del *p*-aminofenol y del acetaminofeno, que son difíciles de separar en estas condiciones. El tiempo de análisis es bastante corto (90s) y no existe ninguna interferencia con el potencial de detección.

3.1.3. Voltaje de inyección

La cantidad de analito que se introduce en el sistema depende del voltaje de inyección aplicado, tal y como se mencionó en la Subsección 1.2.4. Este parámetro está directamente relacionado con el tiempo de inyección, dado que ambos deben estar compensados para evitar que durante la inyección se utilicen tiempos muy largos o voltajes muy elevados.

El voltaje de inyección debe optimizarse para evitar que grandes cantidades de muestra entren en el microchip, debido a que así disminuye mucho el número de experimentos que pueden realizarse sin volver a realizar el acondicionamiento de los microcanales. En la Figura 3.4 se muestran los electroferogramas obtenidos de la disolución mezcla utilizando diferentes voltajes de inyección.

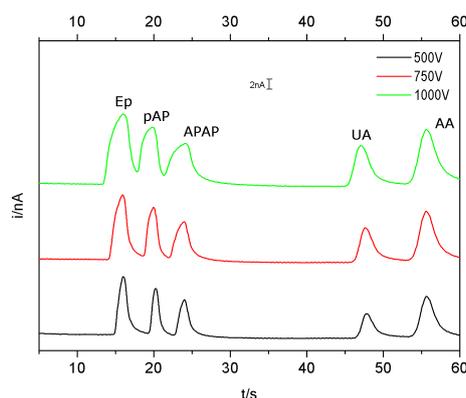


Figura 3.4.: Optimización de V_{iny} (+500V, +750V y +1000V) empleando las siguientes condiciones instrumentales: $V_{sep} = +1250V$; $V_{det} = +0,8V$; $t_{iny} = 6s$; $N = 4$.

Las resoluciones de los picos se muestran en el Cuadro A.2 del Apéndice. La resolución disminuye a medida que aumenta el voltaje de inyección, debido a que se introduce una mayor cantidad de muestra y los picos se hacen cada vez más anchos. Aunque la máxima resolución se alcanza utilizando un voltaje de inyección de +500V, la optimización se llevó a cabo utilizando un tiempo de inyección muy largo (6s). Por ello, se escoge un voltaje de inyección de +750V.

3.1.4. Tiempo de inyección

La optimización del tiempo de inyección se ajusta a un potencial de inyección de +750V. Los electroferogramas obtenidos utilizando diferentes tiempos de inyección se muestran en la Figura 3.5.

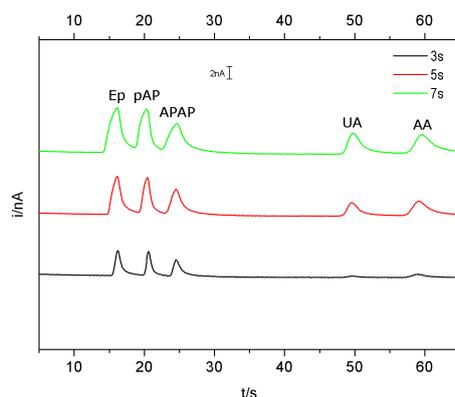


Figura 3.5.: Optimización de t_{iny} (3s, 5s y 7s) empleando las siguientes condiciones instrumentales: $V_{iny} = +750V$; $V_{sep} = +1250V$; $V_{det} = +0,8V$; $N = 4$.

Las resoluciones de los picos se muestran en el Cuadro A.3 del Apéndice. Para el potencial de inyección utilizado, puede comprobarse como con un tiempo de inyección de 5s se consigue la máxima resolución para todos los picos.

3.1.5. Precisión

Se realizan 15 inyecciones sucesivas manteniendo las condiciones experimentales ya optimizadas para evaluar la precisión. Los electroferogramas obtenidos se muestran en la Figura 3.6.

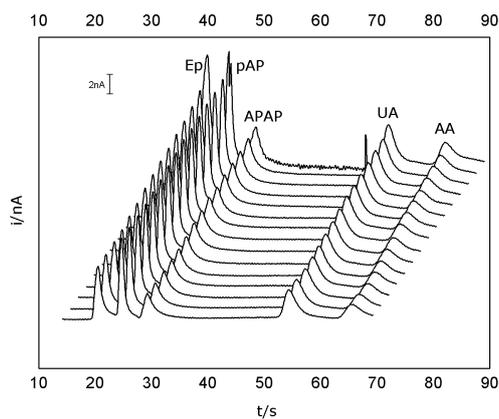


Figura 3.6.: Electroferogramas obtenidos de forma consecutiva empleando las siguientes condiciones instrumentales: $V_{iny} = +750V$; $V_{sep} = +1250V$; $V_{det} = +0,8V$; $t_{iny} = 3s$.

Los parámetros analíticos de los electroferogramas se muestrab en el Cuadro A.4 del Apéndice.

3.1.6. Calibrado

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas, se obtienen los electroferogramas de cuatro patrones que contienen diferentes concentraciones de todos los analitos, presentados en la Figura 3.7.

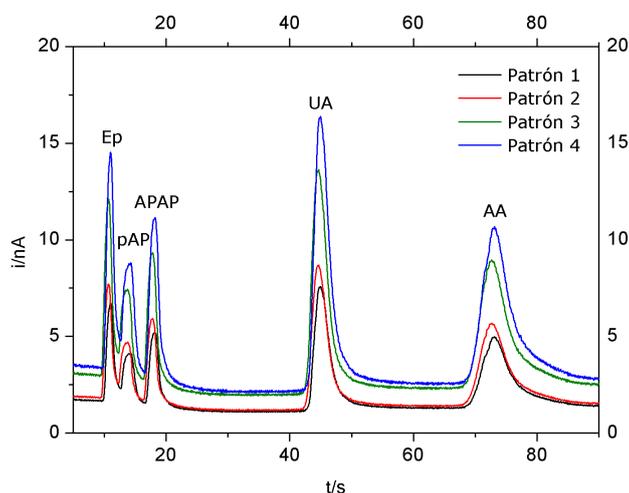


Figura 3.7.: Electroferogramas de los patrones.

Se utilizan las alturas de pico para elaborar el calibrado, tal y como se indica en el Cuadro A.5 del Apéndice. Para evitar posibles errores sistemáticos en el calibrado, se lavó el microchip entre la inyección de un patrón y el siguiente.

Las rectas de calibrado se muestran en la Figura 3.8.

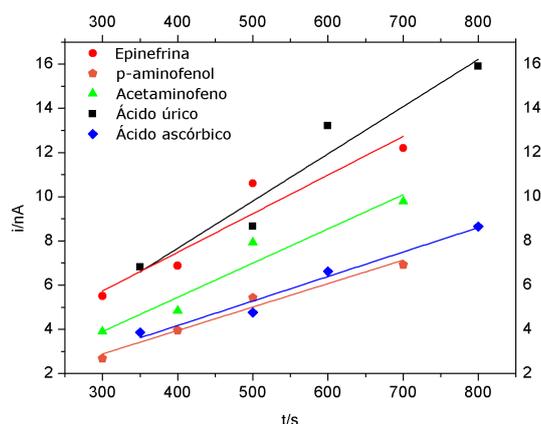


Figura 3.8.: Curvas de calibrado para cada uno de los compuestos estudiados.

Las ecuaciones de las rectas de calibrado y los límites de detección² se indican en el Cuadro A.6 del Apéndice. Para la evaluación de estos últimos, se emplearon cuatro blancos de calibrado.

3.2. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 2

En el diseño 2 únicamente se han optimizado los parámetros analíticos para cuatro de los analitos modelos: EP, pAP, APAP y UA. En este caso el AA no fue empleado debido a su gran irreproducibilidad en las señales analíticas obtenidas.

3.2.1. Voltaje de separación

Los electroferogramas obtenidos a distintos voltajes de separación se muestran en la Figura 3.9.

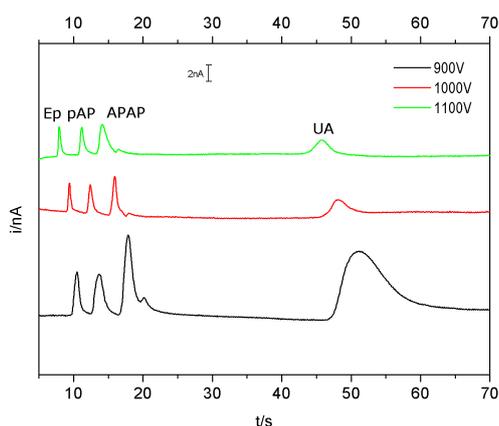


Figura 3.9.: Optimización del V_{sep} (+900V, +1000V y +1100V) empleando las siguientes condiciones instrumentales. $V_{iny} = +200V$; $t_{iny} = 3s$; $V_{det} = +0,8V$; $N = 4$.

Las resoluciones de los picos se muestran en el Cuadro A.7 del Apéndice. Se puede comprobar como la resolución disminuye con el voltaje de separación. Por ello, se elige un voltaje de separación óptimo de +1000V para mantener un compromiso entre el tiempo del análisis y la resolución.

3.2.2. Voltaje de inyección

Los electroferogramas obtenidos a distintos voltajes de inyección se muestran en la Figura 3.10.

² $LOD = \frac{3\sigma_B}{m}$, donde σ_B es la desviación estándar del blanco y m la pendiente de la recta de calibrado.

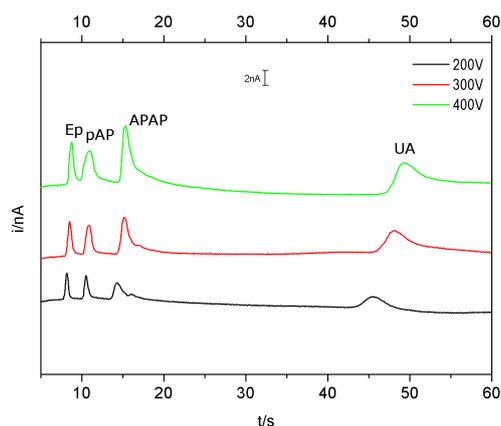


Figura 3.10.: Optimización de V_{iny} (+200V, +300V y +400V) empleando las siguientes condiciones instrumentales. $t_{iny} = 3s$; $V_{sep} = +1200V$; $V_{det} = +0,8V$; $N = 4$.

Las resoluciones de los picos se muestran en el Cuadro A.8 del Apéndice. La máxima resolución se consigue con un voltaje de inyección de +200V, además de obtener una buena sensibilidad.

3.2.3. Tiempo de inyección

Los electroferogramas obtenidos a distintos tiempos de inyección se muestran en la Figura 3.11.

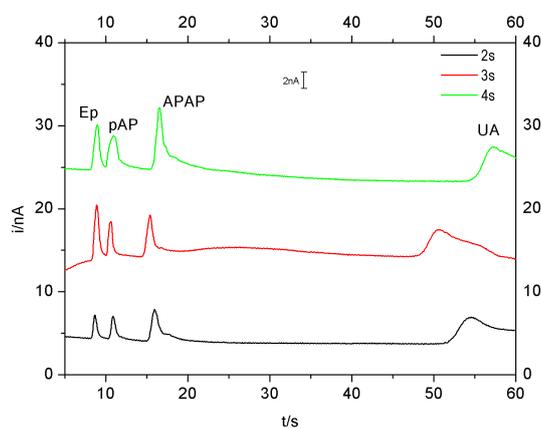


Figura 3.11.: Optimización de t_{iny} (2s, 3s y 4s) empleando las siguientes condiciones instrumentales. $V_{iny} = +200V$; $V_{sep} = +1000V$; $V_{det} = +0,8V$; $N = 4$.

Las resoluciones de los picos se muestran en el Cuadro A.9 del Apéndice. Con un tiempo de inyección de 3s permite obtener una buena sensibilidad sin a penas sacrificar la resolución entre los picos.

3.2.4. Precisión

Se realizan 13 inyecciones sucesivas manteniendo las condiciones experimentales ya optimizadas para evaluar la precisión. Los electroferogramas obtenidos se muestran en la Figura 3.12.

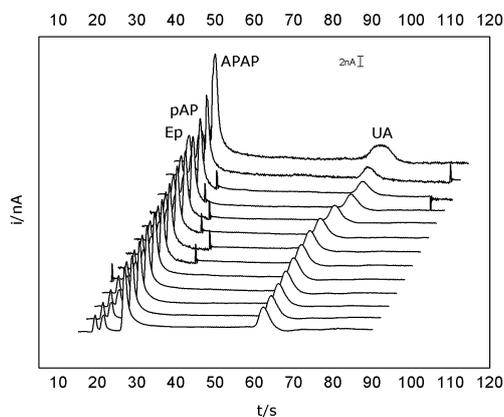


Figura 3.12.: Electroferogramas obtenidos de forma consecutiva empleando las siguientes condiciones instrumentales: $V_{iny} = +200V$; $t_{iny} = 3s$; $V_{sep} = +1000V$; $V_{det} = +0,8V$.

Los parámetros analíticos promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en el Cuadro A.10 del Apéndice.

3.2.5. Calibrado

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas, se obtienen los electroferogramas de cuatro patrones que contienen diferentes concentraciones de todos los analitos, presentados en la Figura 3.13.

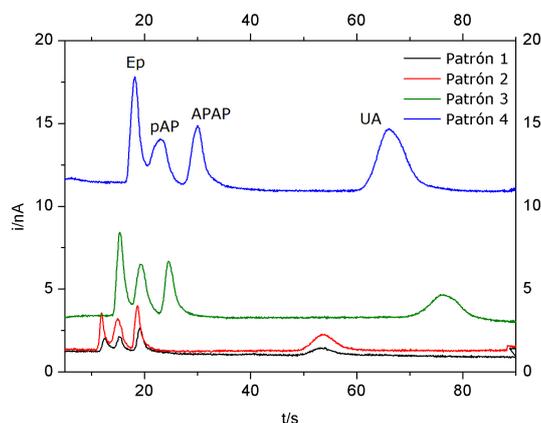


Figura 3.13.: Electroferogramas de los patrones.

Se utilizan las alturas de pico para elaborar el calibrado, tal y como se indica en el Cuadro A.11 del Apéndice. Para evitar posibles errores sistemáticos en el calibrado, se lavó el microchip entre la inyección de un patrón y el siguiente, al igual que en el diseño 1. Las rectas de calibrado sus correspondientes ecuaciones se muestran en la Figura 3.14.

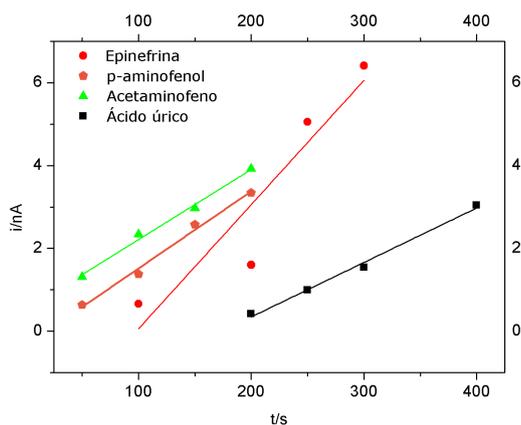


Figura 3.14.: Curvas de calibrado para cada uno de los compuestos estudiados.

Las ecuaciones de las rectas se indican en el Cuadro A.12 del Apéndice.

3.3. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 3

3.3.1. Voltaje de separación

Los electroferogramas obtenidos a distintos voltajes de separación se muestran en la Figura 3.15.

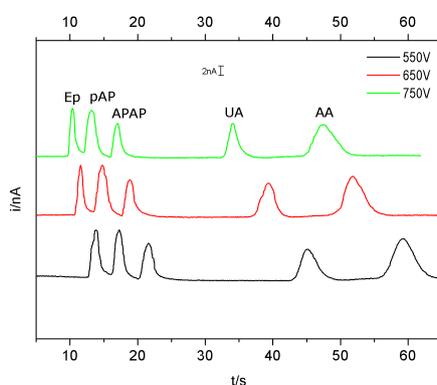


Figura 3.15.: Optimización de V_{sep} (+550V, +650V y +750V) empleando las siguientes condiciones instrumentales. $V_{iny} = +300V$; $V_{det} = +0,8V$; $t_{iny} = 3s$; $N = 4$.

Las resoluciones de los picos se muestran en el Cuadro A.13 del Apéndice. Al contrario que con los diseños 1 y 2, con un voltaje de separación de +550V es posible separar los cinco compuestos con buena resolución.

3.3.2. Potencial de inyección

Los electroferogramas obtenidos a distintos voltajes de inyección se muestran en la Figura 3.16.

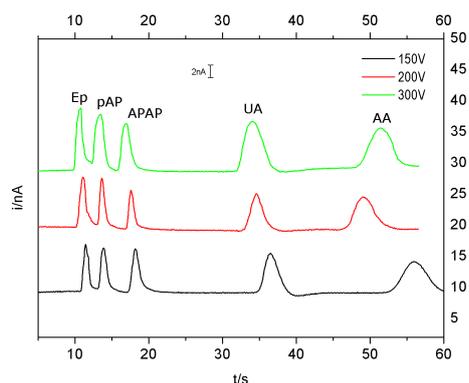


Figura 3.16.: Optimización de V_{iny} (+150V, +200V y +300V) empleando las siguientes condiciones instrumentales. $V_{\text{sep}} = +550\text{V}$; $V_{\text{det}} = +0,8\text{V}$; $t_{\text{iny}} = 3\text{s}$; $N = 4$.

Las resoluciones de los picos se muestran en el Cuadro A.14 del Apéndice. Como se puede apreciar, un voltaje de inyección de +150V es suficiente para conseguir una buena sensibilidad en todos los picos. La posibilidad de utilizar un voltaje tan bajo se debe al inyector en doble T, debido a que durante la inyección se define un bolo de muestra más grande cuyo centro se dispersa mucho menos a los largo del canal de separación, mejorando la sensibilidad.

3.3.3. Tiempo de inyección

Los electroferogramas obtenidos a distintos tiempos de inyección se muestran en la Figura 3.17.

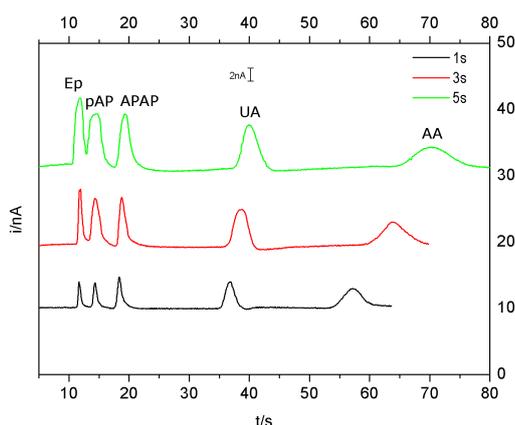


Figura 3.17.: Optimización del t_{iny} (1s, 3s y 5s) empleando las siguientes condiciones instrumentales. $V_{\text{sep}} = +550\text{V}$; $V_{\text{det}} = +0,8\text{V}$; $V_{\text{iny}} = +150\text{V}$; $N = 4$.

Las resoluciones de los picos se muestran en el Cuadro A.15. Como se puede apreciar, un tiempo de inyección de 3s permite obtener una buena sensibilidad sin a penas sacrificar la resolución entre los picos.

3.3.4. Precisión

Se realizan 13 inyecciones sucesivas manteniendo las condiciones experimentales ya optimizadas para evaluar la precisión. Los electroferogramas obtenidos se muestran en la Figura 3.18.

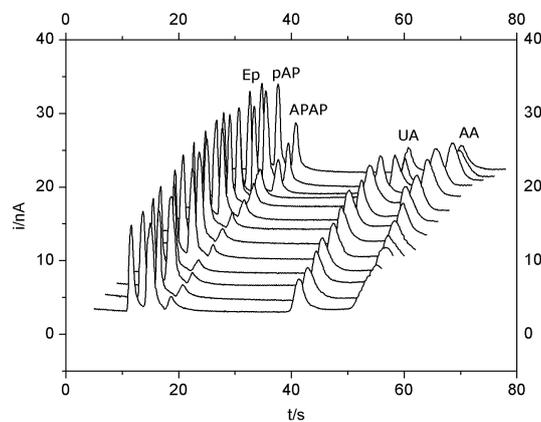


Figura 3.18.: Electroferogramas obtenidos de forma consecutiva empleando las siguientes condiciones instrumentales: $V_{iny} = +150V$, $V_{sep} = +550V$; $V_{det} = +0,8V$; $t_{iny} = 3s$.

Los parámetros analíticos promedio y sus correspondientes desviaciones estándar se presentan en el Cuadro A.16 del Apéndice.

3.3.5. Calibrado

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas, se obtienen los electroferogramas de cuatro patrones que contienen diferentes concentraciones de todos los analitos, presentados en la Figura 3.19.

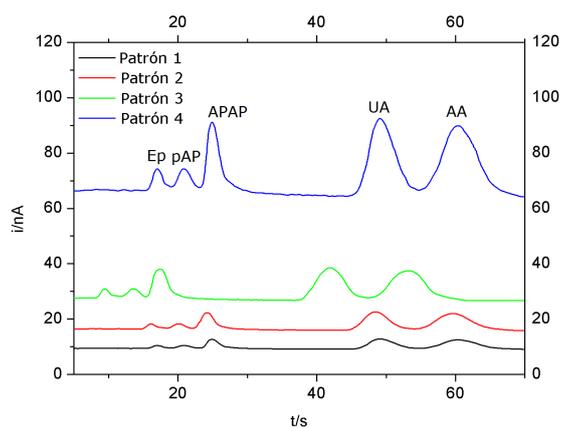


Figura 3.19.: Electroferogramas de los patrones.

Se utilizan las alturas de pico para elaborar el calibrado, tal y como se indica en el Cuadro A.17 del Apéndice. Para evitar posibles errores sistemáticos en el calibrado, se lavó el microchip entre la inyección de un patrón y el siguiente, al igual que en los diseños 1 y 2. Las rectas de calibrado muestran en la Figura 3.20.

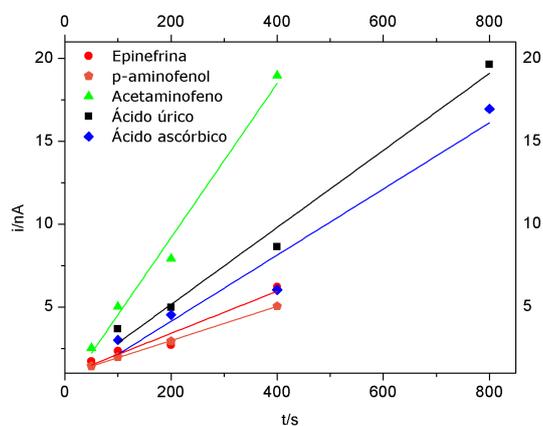


Figura 3.20.: Regresiones lineales para cada uno de los compuestos estudiados.

Las ecuaciones de las rectas de calibrado se muestran en el Cuadro A.18 del Apéndice.

4. Conclusiones

Para el desarrollo de los tres diseños de ME con detección electroquímica, se optimizaron las distintas condiciones instrumentales para el análisis simultáneo de ácido úrico y de sus interferentes. Se evaluaron los potenciales y tiempos de inyección y separación, además de la precisión en los parámetros analíticos obtenidos a partir de los electroferogramas.

Con las optimizaciones realizadas, se obtuvieron calibrados de todos los analitos estudiados para cada uno de los diseños de ME. Con todos ellos se obtuvieron buenos resultados, siendo el diseño 3 con un inyector de doble T el más interesante desde un punto de vista analítico, por la elevada sensibilidad y resolución de las señales obtenidas.

Sin embargo, el lavado previo de los microcanales influye mucho en la reproducibilidad de los resultados. Debido a que este proceso debe realizarse de forma manual, el uso de estos sistemas requiere de un largo tiempo de acondicionamiento previo. Por ello, la automatización de la etapa de lavado puede suponer un futuro trabajo que sin duda facilitaría el uso de estos sistemas.

La miniaturización de los MEs no afecta significativamente a sus propiedades analíticas e instrumentales, pero sí de forma directa a su precio. Así, los diseños 2 y 3 tienen un coste tres veces inferior al diseño 1, pudiendo incluso mejorar muchos parámetros analíticos.

Además, los diseños 2 y 3 de MEs presentan sensibilidades y límites de detección adecuados para el análisis de muestras reales.

A. Apéndice

A.1. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 1

	+500V	+750V	+1000V	+1250V	+1500V
$R_s(Ep - pAP)$	1,54 ± 0,09	1,02 ± 0,09	1,02 ± 0,08	1,24 ± 0,07	1,02 ± 0,05
$R_s(pAP - APAP)$	1,45 ± 0,08	0,8 ± 0,2	0,75 ± 0,06	0,71 ± 0,06	0,77 ± 0,06
$R_s(APAP - UA)$	13 ± 1	6,3 ± 0,3	4,2 ± 0,5	5,2 ± 0,3	4,9 ± 0,4
$R_s(UA - AA)$	0,74 ± 0,02	2,32 ± 0,08	1,76 ± 0,07	1,95 ± 0,07	2,45 ± 0,03

Cuadro A.1.: Resoluciones de pico para los electroferogramas obtenidos a diferentes voltajes de separación.

	+500V	+750V	+1000V
$R_s(Ep - pAP)$	0,98 ± 0,02	0,93 ± 0,04	0,91 ± 0,05
$R_s(pAP - APAP)$	0,99 ± 0,03	0,94 ± 0,02	0,95 ± 0,04
$R_s(APAP - UA)$	4,6 ± 0,3	3,9 ± 0,2	3,5 ± 0,6
$R_s(UA - AA)$	1,2 ± 0,4	1,4 ± 0,3	0,94 ± 0,09

Cuadro A.2.: Resoluciones de pico para los electroferogramas obtenidos a diferentes voltajes de inyección.

	3s	5s	7s
$R_s(Ep - pAP)$	1,08 ± 0,03	1,02 ± 0,02	0,94 ± 0,04
$R_s(pAP - APAP)$	0,95 ± 0,06	0,90 ± 0,05	0,94 ± 0,02
$R_s(APAP - UA)$	6,6 ± 0,2	4,8 ± 0,1	4,06 ± 0,03
$R_s(UA - AA)$	2,7 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,43 ± 0,01

Cuadro A.3.: Resoluciones de pico para los electroferogramas obtenidos a diferentes tiempos de inyección.

	i_p/nA	t_M/s	ω/s	$\omega_{1/2}/s$	N
<i>Epinefrina</i>	16 ± 2	$16,2 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$	$1,26 \pm 0,07$	919 ± 93
<i>p-aminofenol</i>	18 ± 2	$20,2 \pm 0,2$	$2,93 \pm 0,07$	$70,97 \pm 0,05$	2442 ± 277
<i>Acetaminofeno</i>	13 ± 1	$23,5 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,5$	$1,75 \pm 0,03$	1111 ± 47
<i>Ácido úrico</i>	$2,9 \pm 0,5$	$49,2 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,6$	$2,1 \pm 0,1$	2987 ± 410
<i>Ácido ascórbico</i>	$1,5 \pm 0,2$	60 ± 1	$6,0 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,7$	2484 ± 292

R_s	
$R_s (Ep - pAP)$	$0,9 \pm 0,1$
$R_s (pAP - APAP)$	$0,9 \pm 0,2$
$R_s (APAP - UA)$	$4,01 \pm 0,03$
$R_s (UA - AA)$	$1,41 \pm 0,01$

Cuadro A.4.: Evaluación de la precisión de los parámetros analíticos principales.

	PATRÓN 1		PATRÓN 2		PATRÓN 3		PATRÓN 4	
	$C/\mu M$	i_p/nA	$C/\mu M$	i_p/nA	$C/\mu M$	i_p/nA	$C/\mu M$	i_p/nA
<i>Epinefrina</i>	300	$5,5 \pm 0,6$	400	$6,9 \pm 0,8$	500	$10,6 \pm 0,9$	700	12 ± 1
<i>p-aminofenol</i>	300	$2,7 \pm 0,4$	400	$4,0 \pm 0,1$	500	$5,4 \pm 0,7$	700	$6,9 \pm 0,8$
<i>Acetaminofeno</i>	300	$3,9 \pm 0,3$	400	$4,8 \pm 0,5$	500	$7,9 \pm 0,8$	700	10 ± 1
<i>Ácido úrico</i>	350	$6,8 \pm 0,5$	500	$8,6 \pm 0,8$	600	$13,2 \pm 0,9$	800	15 ± 1
<i>Ácido ascórbico</i>	350	$3,8 \pm 0,4$	500	$4,9 \pm 0,6$	600	$6,7 \pm 0,7$	800	$8,7 \pm 0,9$

Cuadro A.5.: Concentraciones de los patrones preparados para el calibrado. $N = 4$.

	<i>Ecuación de la recta</i>	r	$LOD/\mu M$
<i>Epinefrina</i>	$y = 0,5 + 0,0175x$	0.932	70
<i>p-aminofenol</i>	$y = -0,29 + 0,0106x$	0,980	175
<i>Acetaminofeno</i>	$y = -0,741 + 0,0155x$	0,959	200
<i>Ácido úrico</i>	$y = -0,878 + 0,0214x$	0.954	250
<i>Ácido ascórbico</i>	$y = -0,264 + 0,0111x$	0.978	200

Cuadro A.6.: Ecuaciones de las rectas de calibrado y límites de detección para los compuestos estudiados.

A.2. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 2

	+900V	+1000V	+1100V
$R_s (Ep - pAP)$	$1,09 \pm 0,07$	$0,89 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,02$
$R_s (pAP - APAP)$	$1,24 \pm 0,05$	$1,15 \pm 0,06$	$0,99 \pm 0,02$
$R_s (APAP - UA)$	$7,0 \pm 0,7$	$5,6 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,3$

Cuadro A.7.: Resoluciones de pico para los electroferogramas obtenidos a diferentes voltajes de separación.

	+200V	+300V	+400V
$R_s (Ep - pAP)$	$0,93 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,05$
$R_s (pAP - APAP)$	$1,14 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,03$
$R_s (APAP - UA)$	8 ± 1	$6,4 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,2$

Cuadro A.8.: Resoluciones de pico para los electroferogramas obtenidos a diferentes voltajes de inyección.

	2s	3s	4s
$R_s (Ep - pAP)$	$0,94 \pm 0,04$	$0,88 \pm 0,05$	$0,75 \pm 0,04$
$R_s (pAP - APAP)$	$2,01 \pm 0,07$	$1,33 \pm 0,7$	$1,04 \pm 0,04$
$R_s (APAP - UA)$	$8,6 \pm 0,7$	$8,1 \pm 0,06$	$8,0 \pm 0,8$

Cuadro A.9.: Resoluciones de pico para los electroferogramas obtenidos a diferentes tiempos de inyección.

	i_p/nA	t_M/s	ω/s	$\omega_{1/2}/s$	N
<i>Epinefrina</i>	$3,27 \pm 0,03$	$9,35 \pm 0,01$	$1,4 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$	2537 ± 560
<i>p-aminofenol</i>	$2,9 \pm 0,1$	$11,5 \pm 0,9$	$2,5 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,5$	504 ± 103
<i>Acetaminofeno</i>	12 ± 1	16 ± 1	$7,3 \pm 0,8$	$1,23 \pm 0,7$	936 ± 235
<i>Ácido úrico</i>	$3,9 \pm 0,6$	51 ± 2	9 ± 1	3 ± 1	1757 ± 354

	R_s
$R_s (Ep - pAP)$	$0,9 \pm 0,1$
$R_s (pAP - APAP)$	$1,29 \pm 0,06$
$R_s (APAP - UA)$	$8,5 \pm 0,4$

Cuadro A.10.: Evaluación de la precisión de los parámetros analíticos principales.

	PATRÓN 1		PATRÓN 2		PATRÓN 3		PATRÓN 4	
	$C/\mu M$	i_p/nA	$C/\mu M$	i_p/nA	$C/\mu M$	i_p/nA	$C/\mu M$	i_p/nA
<i>Epinefrina</i>	100	$0,66 \pm 0,03$	200	$1,6 \pm 0,1$	250	$5,1 \pm 0,7$	300	$6,4 \pm 0,7$
<i>p-aminofenol</i>	50	$0,64 \pm 0,04$	100	$1,4 \pm 0,2$	150	$2,6 \pm 0,6$	200	$3,3 \pm 0,4$
<i>Acetaminofeno</i>	50	$1,31 \pm 0,08$	100	$2,3 \pm 0,5$	150	$3,0 \pm 0,1$	200	$3,9 \pm 0,6$
<i>Ácido úrico</i>	200	$0,42 \pm 0,02$	250	$0,99 \pm 0,04$	300	$1,5 \pm 0,6$	400	$3,0 \pm 0,5$

Cuadro A.11.: Concentraciones de los patrones preparados para el calibrado.

	<i>Ecuación de la recta</i>	<i>r</i>	<i>LOD/μM</i>
<i>Epinefrina</i>	$y = -2,94 + 0,03x$	0,951	50
<i>p-aminofenol</i>	$y = -0,35 + 0,019x$	0,993	25
<i>Acetaminofeno</i>	$y = 0,52 + 0,017x$	0,993	75
<i>Ácido úrico</i>	$y = -2,28 + 0,013x$	0,995	150

Cuadro A.12.: Ecuaciones de las rectas de regresión de cada uno de los compuestos estudiados.

A.3. Optimización de los parámetros analíticos para el diseño 3

	<i>+550V</i>	<i>+650V</i>	<i>+750V</i>
$R_s (Ep - pAP)$	$0,86 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,02$
$R_s (pAP - APAP)$	$1,65 \pm 0,05$	$1,59 \pm 0,03$	$1,52 \pm 0,04$
$R_s (APAP - UA)$	$6,6 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$
$R_s (UA - AA)$	$4,2 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$

Cuadro A.13.: Resoluciones de pico para los electroferogramas obtenidos a diferentes voltajes de separación.

	+550V	+650V	+750V
$R_s (Ep - pAP)$	$0,89 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,05$	$0,86 \pm 0,04$
$R_s (pAP - APAP)$	$1,75 \pm 0,06$	$1,58 \pm 0,04$	$1,20 \pm 0,08$
$R_s (APAP - UA)$	$6,4 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,5$
$R_s (UA - AA)$	$5,2 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,4$

Cuadro A.14.: Resoluciones de pico para los electroferogramas obtenidos a diferentes voltajes de inyección.

	1s	3s	5s
$R_s (Ep - pAP)$	$0,88 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,01$
$R_s (pAP - APAP)$	$1,95 \pm 0,03$	$1,59 \pm 0,01$	$1,46 \pm 0,03$
$R_s (APAP - UA)$	$6,3 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,1$
$R_s (UA - AA)$	$5,3 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,3$

Cuadro A.15.: Resoluciones de pico para los electroferogramas obtenidos a diferentes tiempos de inyección.

	i_p/nA	t_M/s	ω/s	$\omega_{1/2}/s$	N
<i>Epinefrina</i>	11 ± 1	$11,0 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,7$	670 ± 97
<i>p-aminofenol</i>	12 ± 1	$13,9 \pm 0,1$	$3,27 \pm 0,08$	$1,0 \pm 0,1$	1016 ± 300
<i>Acetaminofeno</i>	$1,5 \pm 0,6$	$17,6 \pm 0,2$	$3,8 \pm 1$	$1,3 \pm 0,7$	965 ± 421
<i>Ácido úrico</i>	5 ± 1	$37,8 \pm 0,1$	$6,54 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,2$	1881 ± 565
<i>Ácido ascórbico</i>	5 ± 1	$48,5 \pm 0,4$	7 ± 1	$2,7 \pm 0,1$	1802 ± 512

	R_s
$R_s (Ep - pAP)$	$1,0 \pm 0,1$
$R_s (pAP - APAP)$	$1,70 \pm 0,03$
$R_s (APAP - UA)$	$6,5 \pm 0,2$
$R_s (UA - AA)$	$5,0 \pm 0,3$

Cuadro A.16.: Evaluación de la precisión de los parámetros analíticos principales.

	PATRÓN 1		PATRÓN 2		PATRÓN 3		PATRÓN 4	
	$C/\mu M$	i_p/nA	$C/\mu M$	i_p/nA	$C/\mu M$	i_p/nA	$C/\mu M$	i_p/nA
<i>Epinefrina</i>	50	$1,73 \pm 0,02$	100	$2,34 \pm 0,06$	200	$2,71 \pm 0,07$	400	$6,2 \pm 0,2$
<i>p-aminofenol</i>	50	$1,42 \pm 0,01$	100	$1,98 \pm 0,04$	200	$2,9 \pm 0,2$	400	$5,1 \pm 0,5$
<i>Acetaminofeno</i>	50	$2,5 \pm 0,1$	100	$5,0 \pm 0,1$	200	7 ± 1	400	18 ± 2
<i>Ácido úrico</i>	100	$3,66 \pm 0,2$	200	$4,9 \pm 0,3$	400	$8,6 \pm 0,6$	800	19 ± 1
<i>Ácido úrico</i>	100	$3,0 \pm 0,1$	200	$4,5 \pm 0,2$	400	$6,0 \pm 0,7$	800	17 ± 1

Cuadro A.17.: Concentraciones de los patrones preparados para el calibrado.

	<i>Ecuación de la recta</i>	<i>r</i>	<i>LOD</i>
<i>Epinefrina</i>	$y = 0,86 + 0,013x$	0,958	25
<i>p-aminofenol</i>	$y = 0,45 + 0,015x$	0,999	35
<i>Acetaminofeno</i>	$y = -0,12 + 0,047x$	0,988	30
<i>Ácido úrico</i>	$y = 0,50 + 0,023x$	0,995	75
<i>Ácido ascórbico</i>	$y = 0,15 + 0,199x$	0,962	50

Cuadro A.18.: Ecuaciones de las rectas de calibrado de cada uno de los compuestos estudiados.

Bibliografía

- [1] Tiina Sikanen. *SU8Based Microchips for Capillary Electrophoresis and Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Universidad de Helsinki, 2007.
- [2] Blanco Romero, Eva. *Desarrollo de nuevas metodologías analíticas basadas en la electroforesis capilar en medios no acuosos para la determinación de contaminantes emergentes en muestras medioambientales*. Universidad de Santiago de Compostela, 2009.
- [3] Markéta Vlčková. *Microchip electrophoresis bioanalytical applications*. Universidad de Basel, 2008.
- [4] Agustín González Crevillén. *Nuevas estrategias electrocinéticas y nuevas aportaciones a la detección electroquímica en microchips de electroforesis capilar basadas en el empleo de nanotubos de carbono y otras nanoestructuras*. Universidad de Alcalá, 2009.
- [5] Ana Fernández-la-Villa, Diego F. Pozo-Ayuso, Mario Castaño-Álvarez. *New analytical portable instrument for microchip electrophoresis with electrochemical detection*. *Electrophoresis* 2010, 31, 2641–2649.
- [6] Agustín González Crevillén, Miriam Hervás, Miguel Ángel López, María Cristina González, Alberto Escarpa. *Real sample analysis on microfluidic devices*. *Talanta* 74 (2007) 342–357.
- [7] Santeri Tuomikoski, Sami Franssila. *Free-standing SU-8 microfluidic chips by adhesive bonding and release etching*. *Sensors and Actuators A: Physical* Volume 120, 17 May 2005, 408–415.
- [8] Irena Nikcevic, Aigars Piruska, Kenneth R. Wehmeyer, Carl J. Seliskar, Patrick A. Limbach, William R. Heineman. *Parallel separations using capillary electrophoresis on a multi-lane microchip with multiplexed laser-induced fluorescence detection*. *Electrophoresis* 2010, 31, 2796–2803.
- [9] Nigel P. Beard, Andrew J. de Mello. *A polydimethylsiloxane/glass capillary electrophoresis microchip for the analysis of biogenic amines using indirect fluorescence detection*. *Electrophoresis* 2002, 23, 1722–1730.
- [10] C. S. Effenhauser, G. J. M. Bruin, and A. Paulus. *Integrated Capillary Electrophoresis on Flexible Silicone Microdevices*. *Anal. Chem.*, vol. 69, pp. 3451–3457, 1997.
- [11] S. C. Jacobson, R. Hergenroder, L. B. Koutny, and J. M. Ramsey. *High-speed separations on a microchip*. *Anal. Chem.*, vol. 66, pp. 1114–1118, 1994.
- [12] D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, L. Di, and H. M. Widmer. *Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip*. *Anal. Chem.*, vol. 64, pp. 1926–1932, 1992.
- [13] A.J. Bard, L.R. Faulkner. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*. Segunda edición. Universidad de Texas, USA. John Wiley & Sons.

- [14] J. P. Landers. *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated micro-techniques*. Tercera edición. CRC Press.