

Tesis doctoral

---

Departament de Genètica i de Microbiologia

Disseny, simulació i prototipatge  
de dispositius per a la detecció  
de matèria orgànica en mostres d'aigua

---

Albert Torrents Sallent

Jordi Mas Gordi

Tutor

Francisco Javier del Campo García

Francesc Xavier Muñoz Pascual

Directores

## Índex:

1. Objectius .....	1
2. Introducció.....	2
2.1. La mesura de la DBO (Demanda Bioquímica d'Oxigen) .....	4
2.1.1. Els mètodes de $s_T$ BOD o DBO ràpida .....	5
2.1.2. Respiròmetres i mesures en continu (introduir el tema de MEDRA) .....	6
2.2. Principis de funcionament dels sensors electroquímics .....	7
2.2.1. Punts forts i flaqueses del mètode electroquímic.....	7
2.3. Aspectes de la miniaturització: microfluídica i altres elements.....	9
2.3.1. Fluídics.....	9
2.3.2. Per mida.....	10
2.3.3. Anàlisi in situ .....	11
2.4. Bibliografia:.....	12
3. Simulació.....	15
3.1. Introducció .....	15
3.2. Mètode utilitzat .....	17
3.3. Model desenvolupat .....	19
3.3.1. Transport de massa .....	19
3.3.2. Cinètica de l'elèctrode.....	22
3.3.3. Reaccions químiques acoblades .....	28
3.4. Paràmetres i valors utilitzats.....	31
3.4.1. Geometria del sistema .....	32
3.4.2. Composició del medi i transport de masses .....	33
3.4.3. Reacció biològica .....	34
3.4.4. Model electroquímic.....	35
3.5. Comentaris dels resoladors.....	36
3.5.1. Establiment de les condicions inicials.....	36
3.5.2. Mallat i precisió .....	37
3.5.3. Requeriments de càlcul .....	38
3.6. Anàlisis paramètriques .....	41
3.7. Resultats de les simulacions .....	42
3.7.1. Transport d'oxigen i membranes de separació.....	43
3.7.2. Cinètica de la respiració.....	48
3.7.3. Detecció electroquímica de l'oxigen.....	53
3.7.4. Emplaçament i funcionament de l'elèctrode de treball.....	54
3.7.5. Consum d'oxigen a la superfície de l'elèctrode i l'ús de múltiples elèctrodes.....	56
3.8. Conclusions.....	59
3.9. bibliografia.....	61
4. Prototipatge i fabricació.....	63

4.1.	Introducció .....	63
4.2.	Tecnologies .....	64
4.2.1.	Microfabricació .....	64
4.2.2.	Prototipatge ràpid.....	71
4.2.3.	Materials membranes de separació.....	74
4.2.4.	Carcasa.....	76
4.2.5.	Alineament.....	79
4.3.	Muntatge experimental .....	81
4.4.	Validació dels prototips.....	84
4.4.1.	Elèctrodes .....	84
4.4.2.	Membranes i canals.....	84
4.4.3.	Efecte del pH en les mesures .....	87
4.4.4.	Proves amb un canal .....	89
4.4.5.	Proves amb dos canals i membrana.....	93
4.5.	Conclusions .....	98
4.6.	Bibliografia.....	101
5.	Escalat del sistema (projecte MEDRA) .....	103
5.1.	Introducció .....	103
5.1.1.	Diferències conceptuals rellevants .....	103
5.2.	Disseny del dispositiu .....	105
5.2.1.	Condicions inicials .....	105
5.2.2.	Evolució dels dissenys proposats .....	106
5.2.3.	Diferències rellevants respecte al dispositiu de mesura ràpida de la DBO .....	109
5.2.4.	Connexió dels sensors al circuit .....	109
5.2.5.	Disseny definitiu proposat.....	111
5.3.	Conclusions .....	113
5.4.	Bibliografia.....	114
6.	Futurs desenvolupaments.....	115
7.	Annexos .....	101
	Annex 1: Sensor de la DBO en curt temps .....	102
	Annex 2: Patent del sensor de la DBO .....	125
	Annex 3: <i>Holder</i> microscopi .....	151

# 1. OBJECTIUS

L'objectiu inicial de la present tesi és la miniaturització d'un sistema per a la mesura ràpida de la DBO en mostres d'aigua. Per això, s'incorporaran cultius microbians a dispositius microfluídics que permeten la realització de mesures electroquímiques.

Aquest camp, que ha experimentat un ràpid creixement en els darrers anys, es basa la utilització d'elements biològics —com són espècies o comunitats microbiològiques, proteïnes o enzims— com a element sensor o com a reactor de mesures electroquímiques.

Aquestes aproximacions haurien de ser vàlides i suficientment ràpides per ser utilitzades com a element de control en àmbits com el seguiment ambiental o processos industrials diversos. Això és rellevant, ja que els mètodes analítics emprats més habitualment requereixen de diversos dies per obtenir els resultats, fet que els fa inadequats per fer el seguiment de processos.

A més a més, es planteja enfocar aquests desenvolupaments donant un paper clau a les eines de simulació i modelització matemàtica, de tal forma que es pugui validar el dispositiu dissenyat, en el major grau possible, abans d'entrar en les fases de fabricació i test experimental.

Si bé les eines de simulació matemàtica ja són àmpliament utilitzades, en la major part dels casos s'utilitzen com a validació de dispositius que ja han estat fabricats i testats. Plantejar les simulacions matemàtiques com una eina combinada en la fase del disseny, implica que aquestes simulacions hauran d'abastar el conjunt d'elements rellevants per al problema o dispositiu, però a la vegada hauran de permetre contrastar els resultats i adaptar el disseny abans de les fases de més requeriments en recursos i temps, que són la fabricació de prototips i la seva validació experimental.

Pel que fa a la fabricació del dispositiu, es maximitzarà l'ús de tecnologies ràpides i de baix cost, tant per al desenvolupament dels diferents prototips, com per ser una construcció remarcable de cara a la seva fabricació i introducció a gran escala.

Finalment, també es tindrà l'objectiu que els dispositius construïts siguin el més versàtils possible, tant de cara a adaptar-los a altres usos i processos analítics com en termes de facilitar-ne la integració en altres dispositius, en la línia del que es coneix com a sistemes de *lab-on-a-chip*.

## 2. INTRODUCCIÓ

En aquest treball es descriu el desenvolupament d'un sensor de la Demanda Biològica d'Oxigen (DBO) per a la detecció ràpida de la concentració de matèria orgànica present en mostres d'aigua (Process 2011), (Anon 2002), (Anon 1998).

Assolir un mètode que permeti conèixer la concentració de la matèria orgànica en mostres d'aigua en períodes curts de temps és clau per poder utilitzar aquest paràmetre com a mecanisme de control, tant en el seguiment de qualitat ambiental com en l'operació d'estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR), ja que els mètodes estàndards actuals tarden un mínim de 5 dies a obtenir resultats, fet que els fa inadequats per ser utilitzats en el control d'operació i el seguiment de la contaminació en temps real.

Com s'ha dit, el treball se centra en el disseny, fabricació i caracterització d'un dispositiu per a l'anàlisi ràpida de la càrrega orgànica en mostres d'aigua o DBO. Per assolir aquest objectiu, es fa un especial ús intensiu de tècniques de simulació i modelització informàtica per tal de preestablir els principals paràmetres de disseny del dispositiu abans d'entrar en la fase de fabricació, estalviant temps i inversió en la fase de desenvolupament del sensor, alhora que permet modificar diverses variables i paràmetres virtualment, i obtenir uns resultats avaluable per tal d'optimitzar i refinar el disseny abans de l'etapa de fabricació. Així mateix, es proven diverses tècniques de prototipatge i fabricació ràpida i econòmica.

El problema analitzat té doncs diferents aspectes interrelacionats però prou independents, ja que abasten aspectes com:

- Definició del model biològic i dels altres aspectes físics i químics claus implicats en el funcionament del dispositiu.
- Elaboració d'un model matemàtic acurat i creïble que permeti d'obtenir informació crítica del sistema abans de la fabricació.
- Implementació de models electroquímics que permetin estimar la viabilitat del sensor.
- Desenvolupament de les tècniques de fabricació adequades per a la construcció dels circuits microfluídics, el sistema d'electrosensors i les membranes de separació.
- Disseny i fabricació d'un encapsulat adequat al sistema desenvolupat.
- Caracteritzar i validar els prototips resultants.

En els punts següents introduïrem les bases i l'estat de l'art actual en alguns aspectes clau tractats en el treball com són la DBO com a mètode analític, les bases de l'anàlisi electroquímica i dels sistemes microfluídics.

Al present treball, definim la demanda bioquímica d'oxigen de diferents maneres segons el context. Per facilitar-ne la lectura els especificuem a continuació:

DBO (Demanda Bioquímica d'Oxigen): ens referim al concepte general de la DBO com a contingut en matèria orgànica en una mostra d'aigua, sense detallar-ne la composició o la seva degradabilitat. Així mateix, a nivell de les simulacions ens referim també a la DBO (o *organics*, indistintament) com a paràmetre en el model que representa el contingut general en matèria orgànica, i les seves unitats sempre seran en mg/l.

DBO<sub>5</sub> (DBO a 5 dies): ens referim a la mesura, per processos analítics estàndards, de la matèria orgànica durant un període de 5 dies. Aquesta mesura és la més utilitzada habitualment i té caràcter normatiu en legislació ambiental i paràmetres de contaminació (Anon 2002; Wang et al. 2010).

DBO<sub>21</sub> (DBO a 21 dies): és la mesura, que en paral·lel a la DBO<sub>5</sub>, permet definir quina part de la matèria orgànica present és fàcilment degradable (DBO<sub>5</sub>), degradable amb lentitud (DBO<sub>21</sub>) o recalcitrant, que tarda més de 21 dies a descompondre's i que es podrà mesurar a partir de mesures totals de la matèria orgànica com són la Demanda Química d'Oxigen (DQO) o sobretot la concentració de Carboni Orgànic Total (COT).

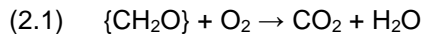
DBO<sub>x</sub> (DBO a x dies): ens referim a qualsevol mesura estàndard de la DBO, siguin quins siguin els dies de durada de la mesura, de manera que inclou tant les DBO a 5 o 7 dies (compostos de degradació ràpida) com la de 21 dies de durada o matèria orgànica de lenta descomposició.

## 2.1. LA MESURA DE LA DBO (DEMANDA BIOQUÍMICA D'OXÍGEN)

La concentració de la matèria orgànica present a l'aigua té una rellevància crítica en diversos àmbits, els quals inclouen aspectes ecològics (p. ex. eutrofització d'aigües marines i continentals, control de qualitat de l'aigua), ambientals (p. ex. funcionament i control de les plantes de tractament d'aigües residuals i potabilització) i processos biotecnològics (processats en la indústria alimentària) (Process 2011).

Atesa la complexitat de la composició de la matèria orgànica que conté la mostra i de la dificultat d'una anàlisi detallada, històricament s'ha establert la tendència a utilitzar mesures indirectes globals que permetin una aproximació útil per als processos que en depenen (Anon 2002). En seran, per tant, factors clau que el mètode analític sigui ràpid, econòmic i que permeti una anàlisi global de tots els compostos orgànics presents en la mostra.

Una via per assolir aquest objectiu és analitzar la quantitat d'oxigen requerit per a una degradació completa de la matèria orgànica present a una mostra determinada (Process 2011). Aquesta aproximació es basa en la descomposició aeròbica de la matèria orgànica, que es pot simplificar com :



Històricament, una mesura comunament utilitzada ha estat la Demanda Química d'Oxigen (DQO). Aquesta anàlisi es basa en el fet que la pràctica totalitat dels compostos orgànics poden ser completament oxidats mitjançant un agent oxidant fort (com és el cas del permanganat de potassi), el qual permet un mètode analític ràpid i econòmic, però que alhora tendeix a sobreestimar el contingut orgànic per tres motius:

- a) Força l'oxidació de tots els compostos reduïts, i no només de la matèria orgànica (per exemple, ió ferrós, sulfurs o compostos reduïts del nitrogen, entre molts d'altres) (Yargeau 2012; Huck & Sozański 2011).
- b) Implica l'oxidació de compostos orgànics recalcitrants o que requereixen temps de descomposició llargs (LDTR, de l'anglès *long decomposition time requiring*), com la lignina o altres fenols i polifenols, que generalment no són afectats —ni presos en consideració— per la majoria de processos abans descrits, com la depuració o potabilització.
- c) Com que l'oxidació es deu totalment a forces químiques, sense intervenció d'agents biològics, no ens dona cap noció de la presència de tòxics o altres materials (polifenols o metalls pesats) que potencialment afectaran els bioprocessos que volem monitoritzar.

En conseqüència, es va desenvolupar l'anàlisi de la Demanda Bioquímica d'Oxigen (DBO<sub>x</sub>), la qual és requerida per la majoria de les administracions (sovint amb paper legal) i ha esdevingut un mètode universalment utilitzat (Anon 2002). El principi analític, en aquest cas, recau en el fet que l'oxidació dels compostos continguts en la mostra és duta a terme per agents biològics (microorganismes presents a l'aigua o afegits a la mostra) en lloc d'agents químics oxidants.

Per dur a terme una anàlisi de la DBO<sub>x</sub>, la mostra s'emplaça en un bioreactor hermètic en el qual després de certs processos d'adaptació, com la correcció de nutrients i l'increment de la biomassa de poblacions endògenes o afegides (R. Kumar & A. Kumar 2005), es manté la mostra durant el temps d'anàlisi en condicions de no limitació de l'oxigen disponible i es mesura l'oxigen global consumit, directament o mitjançant dades indirectes, com els canvis en la pressió de la fase gas del reactor {Jouanneau:uk} .

En comparació de la DQO, les principals aportacions de la DBO<sub>x</sub> són:

- a) Redueix l'oxidació de compostos no orgànics durant l'anàlisi. Només els compostos fàcilment oxidables i capaços, per tant, de ser oxidats pel contingut d'oxigen dissolt en l'aigua com pot ser el ferro patiran algun grau d'oxidació.
- b) Només els compostos que poden ser degradats durant el temps d'anàlisi (vegeu més endavant) són comptabilitzats per al consum d'oxigen (excloent aquells compostos orgànics de molt llarga degradació o LDTR dels resultats).
- c) En cas de que hi hagi compostos tòxics o inhibidors de l'activitat microbiana, queda reflectit per una minva de la demanda d'oxigen total, que es pot estimar contrastant diferents tècniques analítiques com la proporció DBO/DQO.

La preocupació amb l'ús de la  $DBO_x$  es deu al temps requerit d'anàlisi. El mètode més usualment utilitzat és la  $DBO_5$  (on el subíndex indica la durada de l'anàlisi, en dies) implica un període d'anàlisi de 5 dies (alguns països com Suècia exigeixen l'ús de la  $DBO_7$  (Anon 2002), per permetre el creixement dels microorganismes, l'activació de les rutes metabòliques i enzimàtiques i la hidròlisi de polímers. És acceptat que, amb aquesta durada, la major part dels compostos i polímers de fàcil degradació seran oxidats, però no els recalitrants o de llarga degradació (LDTR), per a la determinació dels quals es fan anàlisis de fins a 21 dies o  $DBO_{21}$  (Anon 2002).

Aquest requeriment de temps d'anàlisi fa que la  $DBO_5$  sigui un procés car, que presenti una alta variabilitat i sobretot el fa un mètode inadequat per a processos de monitorització i control en els quals es requereix l'obtenció de dades ràpides i actualitzades.

### 2.1.1. ELS MÈTODES DE ${}_sT$ BOD O DBO RÀPIDA

Enfront de les limitacions que presenten els mètodes de la  $DBO_5$  i la DQO, i per tal de poder obtenir resultats equivalents a la  $DBO_5$  en temps menors, es van començar a desenvolupar biosensors per a la determinació de la  $DBO_x$  en temps curts ( ${}_sT$ BOD, o *short time BOD* en anglès) ja als anys setanta (Karube et al. 1977). La major part d'aquests prototips de biosensors es basen en l'ús d'elèctrodes per a determinació de la concentració d'oxigen, de tipus Clark, que permet una mesura contínua de la concentració d'oxigen en una mostra i, per tant, també del ritme de consum ( $-dO_2/dt$ ) (Karube et al. 1977), Anjum:2004kx, (Anon 2011).

Un altre aspecte clau per intentar assolir una reducció del temps requerit per a l'anàlisi és la cerca de mecanismes que permetin incrementar la concentració d'organismes microbians a la proximitat de l'elèctrode, bé sigui per la via d'introduir la mostra en un cultiu prèviament enriquit de microorganismes o per la via de l'ús de biofilms preformats (tot i que en la majoria de casos, es tracta més de cultius compactats que de biofilms realment desenvolupats) (Liu & Dong n.d.; Anon 2002; Liu et al. 2011; Anjum et al. n.d.).

D'aquesta manera podem obtenir resultats de la DBO en menor temps, però els resultats no seran exactament coincidents amb els valors d'una  $DBO_5$  (Anon 2002) perquè el curt temps d'anàlisi no permetrà la degradació de compostos més complexos i normalment només els fàcilment i ràpidament assimilables es descompondran. Això implica que s'hauran de dur a terme estudis de correlació entre la  $DBO_5$  i la  $DBO_{st}$  per comparar les dades i que aquesta correlació es veurà afectada per la natura de la mostra, tot i que en tot cas es donen correlacions suficientment altes entre ambdós valors, ja que descriuen processos essencialment equivalents, on la principal diferència és la durada en el temps d'anàlisi.

Molts d'aquests mètodes que s'estan desenvolupant parlen d'anàlisis curtes en referència al temps d'anàlisi del sensor (i s'han proposat mètodes molt breus, de 10 minuts (Anon 2002)), però no treu que el temps total solgui incloure períodes d'adaptació de la microbiota i d'inducció



dels enzims requerits, de manera que sovint es requereix un pas de pretractament de la mostra que dóna un temps total de l'anàlisi d'entre una i diverses hores (Anon 2002).

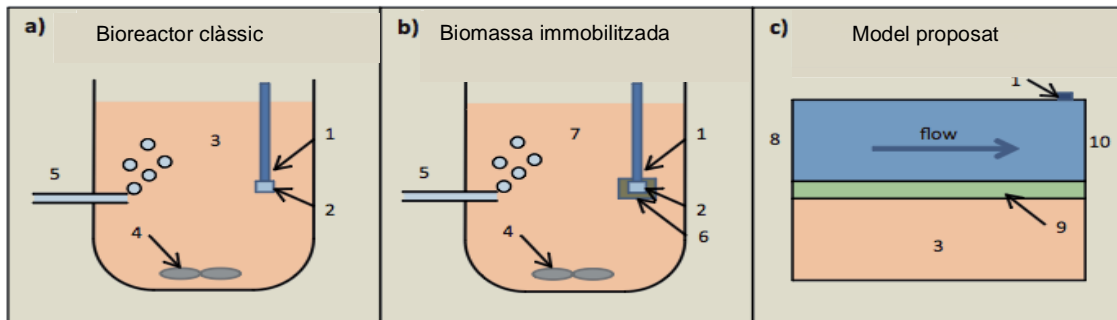


Figura 2.1. Configuracions clàssiques i proposta de sistemes respiromètrics per la mesura de la DBO. (a) Elèctrode tipus Clark, emplaçat directament al bioreactor. (b) Elèctrode tipus Clark modificat amb biomassa compactada a la proximitat de l'elèctrode. (c) Canal de l'electròlit i cambra de separació, separats per una membrana permeable a l'oxigen. Notes: 1. Sensor d'oxigen. 2. Protecció de Teflon (PTFE) contra la passivació de l'elèctrode. 3. Mostra i biomassa bacteriana. 4. Agitador, 5. Subministrament d'oxigen. 6. "Sandwich" o gel per concentrar la biomassa. 7. Mostra sense biomassa. 8. Flux d'electròlit saturat d'oxigen. 9. Membrana selectivament permeable a l'oxigen. 10. Sortida.

## 2.1.2. RESPIRÒMETRES I MESURES EN CONTINU (INTRODUIR EL TEMA DE MEDRA)

Paral·lelament al treball en el dispositiu per a la mesura ràpida de la DBO, s'ha treballat en el projecte MEDRA (referència TSI-020100-2011-187) per a la monitorització, control i optimització de plantes de tractament d'aigües residuals (EDAR) (Process 2011).

En aquest se cercava adaptar la mesura de la respirometria i l'estimació de la càrrega orgànica (DBO) a sistemes de control continu per operar a planta. Si bé inicialment en el projecte es proposaven sistemes microfabricats, ben aviat es veié que podia ser més correcte l'ús de sistemes d'escala major que facilitessin el manteniment i la durabilitat dels sensors.

Tot i això, conceptualment i pel que fa al disseny, compartien molts aspectes amb el treball ja realitzat per desenvolupar un sensor microfabricat de mesura ràpida de la DBO, on essencialment calia adaptar-ho a una escala de mida i temporal major.

En aquest projecte es va treballar sobretot en el disseny i conceptualització del dispositiu, ja que a la part de fabricació, prototipatge i control hi havia altres entitats implicades. El conjunt del treball realitzat per a aquest projecte es detalla al punt 5 del present treball.

## 2.2. PRINCIPIS DE FUNCIONAMENT DELS SENSORS ELECTROQUÍMICS

Es pot mesurar el consum d'oxigen per part de la microbiota (és a dir, fer una respirometria) mitjançant diversos mètodes que permeten fer el balanç químic entre la variació de la concentració d'oxigen inicial i final de l'experiment. Els mètodes més usats són:

- a) Mitjançant la mesura dels canvis de la pressió en un recipient estanc als gasos, comparant el volum de la molècula d'oxigen amb el volum del diòxid de carboni, que és el principal subproducte de la degradació aeròbica (Caldwell & Langelier 1948; Logan & Wagenseller 1993). Aquest sistema és poc adequat per a mesures contínues i no discerneix les variacions de volum causades per altres gasos que es poden formar en el procés, com són compostos de sofre o nitrogen.
- b) Mitjançant la mesura d'oxigen present per mètodes òptics (Jiang et al. 2006), que determinen amb prou exactitud la concentració d'oxigen via la mesura de l'absorbància òptica de longituds d'ona predeterminades per a l'element en estudi (en aquest cas, l'oxigen). Es veu afectat en mostres poc netes on altres compostos poden absorbir part de la llum per a aquella longitud d'ona, sense ser l'espècie química objectiu.
- c) Mitjançant mètodes de mesura electroquímics (Cooper & Compton 1998a; Compton & Winkler 1995), que determinen la concentració d'oxigen present via la mesura de la quantitat d'oxigen que es redueix a la superfície d'un elèctrode al qual s'aplica un potencial determinat que afavoreixi la reducció específica de l'element químic objectiu. Aquest potencial variarà en funció de l'element cercat i de la composició de l'elèctrode.

Aquest darrer mètode electroquímic s'ha mostrat viable i amb resultats adequats per a mesures ràpides en petits dispositius, alhora que és un dels mètodes utilitzats que compta amb més experiència. És per això que ha estat el mètode analític escollit en el present treball.

Essencialment els mètodes electroquímics es basen en la detecció del corrent generat per la reducció o oxidació d'una espècie química específica a la superfície d'un elèctrode al qual s'aplica un potencial conegut. Atès que el punt d'oxoreducció és propi de cada espècie química i que mitjançant un potenciòstat (i un bon sistema d'elèctrodes de referència i auxiliars) podem donar un potencial conegut a l'elèctrode en qüestió, podem propiciar l'oxidació o reducció d'una espècie determinada de forma aïllada respecte dels altres compostos que contingui la mostra.

Aquesta oxidació o reducció implicarà un alliberament o captació d'electrons a la superfície de l'elèctrode de treball que podrà ser mesurat com un corrent generat en el mateix elèctrode (amb valor positiu o negatiu, segons es tracti d'una oxidació o una reducció). I serà aquest corrent el que, un cop corregit per factors com la superfície total de l'elèctrode o la velocitat del flux d'electròlit, permetrà de tenir un valor de l'element químic en estudi, en el nostre cas, l'oxigen.

A continuació descriurem resumidament els aspectes més rellevants que presenten aquests sistemes i el funcionament d'aquests dispositius.

### 2.2.1. PUNTS FORTS I FLAQUESES DEL MÈTODE ELECTROQUÍMIC

#### PUNTS FORTS

Els principals punts forts dels sistemes d'anàlisi electroquímic són:

- a) Versatilitat de les espècies químiques que poden ser analitzades. Això permet no només ser un dels sistemes analítics ràpids més emprats, sinó, potencialment utilitzar el mateix joc d'elèctrodes i dispositiu per a l'anàlisi de diverses espècies químiques de

forma consecutiva. Respecte a l'especificitat de l'anàlisi, aquesta dependrà de l'espècie objectiu, del material de l'elèctrode emprat i de les altres espècies presents en l'anàlisi, però en el cas de l'oxigen, si les mostres són netes, trobem uns millors resultats (Cooper & Compton 1998b).

- b) Una alta sensibilitat que permet de detectar concentracions molt baixes de l'element químic en estudi. Això no limita, emperò, la possibilitat de detectar altes concentracions, ja que és fàcilment regulable mitjançant la modificació del cabal influent al dispositiu.
- c) Anàlisis ràpides i repetibles que seran molt interessants, tant en el sentit de limitar els processos preparatoris de l'anàlisi com també pel fet de poder fer mesures ràpides i repetides en el temps, ja que això significa la possibilitat de fer anàlisis contínues que permetin avaluar en temps gairebé real els processos que es donen al dispositiu i sobretot les seves dinàmiques.

#### PUNTS FEBLES

D'altra banda, tenim que els principals punts febles d'aquesta tècnica són:

- a) La passivació de l'elèctrode és un problema molt comú en experiments electroquímics quan es treballa amb mostres "brutes", ja sigui perquè l'anàlisi objectiu es troba en una mostra complexa o sobretot quan es treballa amb mostres biològiques. Estrictament la passivació de l'elèctrode és la pèrdua en el temps de la seva àrea de bescanvi electrònic. A part d'altres processos, un cas típic és l'adhesió de materials orgànics a la superfície de l'elèctrode, que en canvien les propietats electrocatalítiques. Això se sol minimitzar mitjançant cicles d'activació de l'elèctrode, que són viables només fins a un punt, o bé protegint la superfície de l'elèctrode amb un material en aquest sentit inert, com per exemple amb membranes de Nafion (ref paper Neus), que, tanmateix, presenten problemes com l'homogeneïtat del material dipositat o la difusibilitat de l'espècie objectiu.  
Com a resultat secundari del treball endegat en la present tesi, s'ha proposat un disseny de cel·la electroquímica amb separació per membranes selectivament permeables per tal de poder treballar amb mostres "brutes" tot i mantenint l'anàlisi en contacte amb l'elèctrode net.
- b) El requeriment d'un electròlit net principalment d'espècies químiques que tinguin el punt d'oxidació o reducció pròxima a l'espècie objectiu de l'anàlisi. Aquest problema es pot minimitzar amb la "neteja" de la mostra (filtració, etc.), o amb els materials emprats per a la fabricació de l'elèctrode (ja que aquest definirà el punt de canvi redox de l'espècie objectiu).
- c) Baixa selectivitat de la mesura en el cas d'utilitzar elèctrodes sense modificar. El senyal de la corrent registrada es deurà a la suma de tots els processos que es donin (o es puguin donar) al potencial de mesura.

## 2.3. ASPECTES DE LA MINIATURITZACIÓ: MICROFLUÍDICA I ALTRES ELEMENTS

La miniaturització de sistemes de mesura és un sector que ha mostrat un ràpid creixement en els darrers anys, ja que té certs beneficis inherents, com l'estalvi d'espai i recursos així com una major portabilitat. A continuació detallem els principals aspectes del treball amb microsistemes que ens son rellevants:

### 2.3.1. FLUÍDICS

Hi ha principalment tres aspectes relacionats amb les característiques fluídiques (Tabeling 2005; Ohno et al. 2008), (Whitesides 2006) que seran clau en el disseny del dispositiu desenvolupat:

#### a) Sistemes de flux laminar

El comportament dels fluids a escala micro difereix dels macrofluídics en factors com són la tensió superficial o la resistència al transport (Tabeling 2005), (Acheson 1990). A escales molt petites (entre 100 nanòmetres i alguns centenars de micres) apareixen diverses propietats interessants, entre les quals destaca que els nombres de Reynolds esdevenen molt baixos. El nombre de Reynolds relaciona el moment d'un fluid i l'efecte de la viscositat. Això comporta que el fluid respongui a un flux laminar i a la pràctica desaparició del component turbulent, (vegeu el punt 3.3.1B).

Així, per exemple, tindrem que dos fluids circulant en paral·lel pel mateix canal pràcticament no es barrejaran, ja que les forces inercials (turbulentes) seran molt baixes, però en canvi poden intercanviar compostos a favor del gradient de concentració entre els dos fluids, mitjançant la difusió.

Així el transport de matèria dins del fluid serà majoritàriament difusiu, fet que permet unes condicions de reacció molt més uniformes tant per a reaccions d'un sol pas com multipas (Stone et al. 2004; Tabeling 2005).

D'altra banda, si bé és cert que el transport per difusió és en general molt més lent que el transport convectiu, el fet de treballar en distàncies petites, comporta que això no sigui un element tan limitant com pugui ser-ho en sistemes macroscòpics.

En el dispositiu desenvolupat cal esmentar que les alçades dels canals oscil·len entre les 50 i 150 micres, i tot i que l'amplada estigui entre 500 i 1.000 micres, això no impedeix que es puguin considerar microfluídics en el seu conjunt.

#### b) Volum de mostra

Un altre aspecte molt rellevant dels dispositius microfluídics és que requereixen volums molt petits de mostra. Per exemple, un canal reactor de 0,13 m (l) x 0,005 m (a) x 0,0005 m (h) —com el de bona part dels sistemes simulats— contindrà 0,33 ml de volum total.

Això permet analitzar mostres molt petites i diversos beneficis més (rapidesa, transport, etc.). La constricció en aquest sentit serà utilitzar les mesures necessàries per tal d'assegurar que la mostra analitzada es correspon amb la mostra presa i, per tant, que hi ha una bona selecció de la mostra a analitzar, sobretot quan es parteix de mesclades poc homogènies.

### 2.3.2. PER MIDA

Les aportacions que ens dona el fet de treballar amb dispositius de petita mida els resumirem en els tres aspectes que ens semblen més rellevants, que són els efectes de treballar amb elèctrodes petits, la facilitat per integrar el dispositiu en sistemes analítics majors i com això afecta als costos de fabricació.

#### a) Microelèctrodes

En el nostre cas s'ha optat per elèctrodes de banda compostos de diferents materials.

La principal aportació dels microelèctrodes és que presenten una alta sensibilitat i que aquesta permet fer mesures ràpides i repetides; aquesta sensibilitat es deu a un transport de matèria eficient entre el conjunt de la mostra (*bulk*) i la seva superfície, que es tradueix en un model de transport essencialment del tipus planar entre mostra i elèctrode (ELAN:ELAN141, (Godino Amado et al. 2010), (Ordeig et al. 2007). Alhora, això representa també una limitació ja que el senyal elèctric obtingut serà també menor i, per tant, més influenciable pel soroll elèctric que es pugui donar en el dispositiu.

#### b) Facilitat d'integració amb altres dispositius

Destaquem dos factors en aquest sentit. D'una banda, el fet de dissenyar un dispositiu de petita mida fa que en general aquest sigui més fàcilment integrable amb altres dispositius complementaris a l'anàlisi que es vol dur a terme. D'altra banda, un sistema que requereix una menor aportació energètica tant per fer la mesura (per la mida dels elèctrodes) com pel bombeig de volums molt petits de mostra i electròlit, facilitarà també la integració (Arora 2010; Araci & Brisk 2014).

A tot el treball, se segueix una línia més o menys explícita cap a la reducció de la mida del dispositiu, que òptimament hauria de permetre dos objectius subjacents: 1) permetre que el dispositiu pugui ser mòbil i es puguin fer les anàlisis directament al punt de la presa de mostres, evitant les alteracions causades per l'emmagatzematge i el transport i 2) idealment, dissenyar un dispositiu que pugui ser integrable en un sistema que s'anomena *lab-on-a-chip* o *un laboratori en un xip*, que permeti fer el preparat de la mostra i l'anàlisi en un sol dispositiu o que fins i tot s'hi puguin afegir altres processos analítics que puguin ser complementaris i o rellevants (com proves blanc o repeticions).

#### c) Reducció dels costos de fabricació i limitació en l'ús de productes i processos contaminants o generadors de residus

Aquest també és un patró que hem intentat contemplar de forma transversal en el disseny (del Campo 2014). Sovint els processos de microfabricació són cars i d'alt requeriment energètic, i generadors de residus. En aquest sentit s'hi ha treballat en diferents aspectes, com són:

- 1) Dissenyar dispositius de petita mida que impliquen un millor aprofitament dels processos de fabricació, sobretot pel que fa als dispositius que requereixen sala blanca.
- 2) Provar i utilitzar tècniques noves que permeten una fabricació de menor complexitat tècnica i temps de fabricació com és el cas del que es coneix com a tècniques de prototipatge ràpid. Així, per exemple, es treballa amb eines com

un plòter de tall per a la fabricació dels sistemes microfluídics o les tècniques de fresat en 2D i 3D per a la fabricació de la carcassa o altres elements, s'han d'entendre també en aquest sentit.

A l'apartat de fabricació es comentaran més detalladament aquestes aproximacions i els resultats que se n'ha obtingut.

### 2.3.3. ANÀLISI IN SITU

Tot i que algunes coses ja es dedueixen del comentat en els punts anteriors, considerem que és una part important del disseny realitzat, el fet de focalitzar-se amb sistemes que permetin fer l'anàlisi desitjada amb la màxima proximitat al lloc de recollida de les mostres. Aquesta preocupació es basa essencialment en dos factors:

a) Menor interval entre presa de la mostra i anàlisi

Un problema recurrent en les anàlisis de la DBO és la dificultat d'estabilitzar les condicions de la mostra durant un marge de temps suficient (ref). La conservació a baixa temperatura, la major o menor limitació de la disponibilitat d'oxigen, l'agitació o el creixement bacterià, són factors que sovint es critiquen a l'anàlisi de la DBO i que poden fonamentar part de la repetibilitat baixa d'aquest procés analític en comparació de mètodes parcialment equivalents com poden ser la DQO o el COT (Carboni Orgànic Total).

Així, disposar d'un dispositiu que pot realitzar la mesura immediatament després de la presa de mostres i que requereixi una baixa manipulació, pot ser un enfocament clau de cara a disminuir aquesta variabilitat.

Al present treball, es planteja un filtrat de la mostra per permetre que circuli correctament pel dispositiu microfluídic i un afegit de cultiu microbià concentrat i preactivat, que permeti iniciar el protocol d'anàlisi al mateix moment.

b) Portabilitat

Conseqüentment amb el comentat en el punt anterior, també és un objectiu del disseny, que el dispositiu pugui funcionar en condicions de camp i que no requereixi imprescindiblement ser traslladat a laboratori per tal de fer l'anàlisi.

En aquest sentit, el principal limitant és disposar d'un sistema de mesura electroquímica que o bé estigui en condicions de treballar fora del laboratori o fins i tot que estigui integrat en un sistema *lab-on-a-chip* (Esquivel et al. 2011).

## 2.4. BIBLIOGRAFIA:

- Acheson, D.J., 1990. *Elementary fluid dynamics*, Oxford : Clarendon Press ; New York : Oxford University Press.
- Anjum, M. et al., A disposable BOD microsensor using a polymer substrate. In *IEEE Sensors*, 2004. IEEE, pp. 1202–1205.
- Anon, 2011. Microbial biosensors for detection of biological oxygen demand (a Review). 47(1), pp.1–11.
- Anon, 2002. Microbial BOD sensors for wastewater analysis., 36(15), pp.3786–3802.
- Anon, 1998. *Principles of Water Quality control (Fifth Edition)*, Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Araci, I.E. & Brisk, P., 2014. Recent developments in microfluidic large scale integration. *Analytical biotechnology*, 25 IS -, pp.60–68.
- Arora, 2010. Latest Developments in Micro Total Analysis Systems. *Anal Chem* 82(12), pp.4830–4847.
- Caldwell, D.H. & Langelier, W.F., 1948. Manometric Measurement of the Biochemical Oxygen Demand of Sewage. *Sewage Works Journal*, 20(2), pp.202–218.
- Compton, R.G. & Winkler, J., 1995. Hydrodynamic Voltammetry with Channel Microband Electrodes: Alternating Current Impedance Measurements. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(14), pp.5029–5034.
- Cooper, J.A. & Compton, R.G., 1998a. Channel Electrodes — A Review. *Electroanalysis*, 10(3), pp.141–155.
- Cooper, J.A. & Compton, R.G., 1998b. Channel Electrodes — A Review. *Electroanalysis*, 10(3), pp.141–155.
- del Campo, F.J., 2014. Miniaturization of electrochemical flow devices. *Electrochemistry Communications*, 45, pp.91–94.
- Esquivel, J.P. et al., 2011. Fuel cell-powered microfluidic platform for lab-on-a-chip applications. *Lab on a chip*, 12(1), pp.74–79.
- Godino Amado, N. et al., 2010. *Design and fabrication of miniaturised electroanalytical systems*, Universitat Autònoma de Barcelona. Available at: <http://ddd.uab.cat/record/68249>.
- Huck, P. & Sozański, M., 2011. 3.16 - Chemical Basis for Water Technology. In P. Wilderer, ed. *Treatise on Water Science*. Treatise on Water Science. Oxford: Elsevier, pp. 429–469.
- Jiang, Y. et al., 2006. Optical biosensor for the determination of BOD in seawater. *Talanta*, 70(1), pp.97–103.
- Karube, I. et al., 1977. Microbial electrode BOD sensors. *Biotechnology and bioengineering*, 19(10), pp.1535–1547.
- Kumar, R. & Kumar, A., 2005. WATER ANALYSIS | Biochemical Oxygen Demand. In P. W. T. Poole, ed. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition). Oxford: Elsevier, pp. 315–324.
- Liu, C. & Dong, S., Field application of a biofilm reactor based BOD prototype in Taihu Lake, China. *Talanta*, 109 IS -, pp.147–151.

- Liu, C. et al., 2011. Immobilized multi-species based biosensor for rapid biochemical oxygen demand measurement. *Biosensors & bioelectronics*, 26(5), pp.2074–2079.
- Logan, B.E. & Wagenseller, G.A., 1993. The HBOD Test: A New Method for Determining Biochemical Oxygen Demand. *Water Environment Research*, 65(7), pp.862–868.
- Ohno, K.-I., Tachikawa, K. & Manz, A., 2008. Microfluidics: Applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry. *Electrophoresis*, 29(22), pp.4443–4453.
- Ordeig, O. et al., 2007. Electroanalysis Utilizing Amperometric Microdisk Electrode Arrays. *Electroanalysis*, 19(19-20), pp.1973–1986.
- Process, I.T.G.O.R.I.C.O.T.A.S., 2011. *Respirometry in Control of the Activated Sludge Process: Benchmarking Control Strategies* 2002nd ed. J. B. C. H. S. P. A. Vanrolleghem, ed., IWA Publishing.
- Stone, H.A., Stroock, A.D. & Ajdari, A., 2004. ENGINEERING FLOWS IN SMALL DEVICES. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 36(1), pp.381–411.
- Tabeling, P., 2005. *Introduction to microfluidics*, Oxford, U.K. ; New York : Oxford University Press.
- Wang, J. et al., 2010. An innovative reactor-type biosensor for BOD rapid measurement. *Biosensors & bioelectronics*, 25(7), pp.1705–1709.
- Whitesides, G.M., 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), pp.368–373.
- Yargeau, V., 2012. 17 - Water and wastewater treatment: chemical processes. In F. Zeman, ed. *Woodhead Publishing Series in Energy*. Metropolitan Sustainability. Woodhead Publishing CY -, pp. 390–405.



## 3. SIMULACIÓ

### 3.1. INTRODUCCIÓ

Un dels objectius de la present tesi és aprofitar l'ús d'eines de simulació matemàtica de models complexos per ser emprades en el disseny de sensors biològics. Entenem per simulació l'ús combinat de diferents models ben establerts prèviament i de paràmetres empírics, que es calculen conjuntament per tal de projectar uns resultats que permetin el refinament del disseny de nous dispositius, així com identificar-ne els principals factors condicionants i limitants (McLaughlin n.d.).

Històricament, la proposta de models contrastables ha estat una eina important per a l'establiment i refutació d'hipòtesis científiques, però generalment aquests models s'han limitat a aspectes més o menys concrets i parcials dels problemes abordats. Darrerament, però, la millora en els mètodes matemàtics i sobretot l'increment i abaratiment de les possibilitats de càlcul, han propiciat que s'intentin considerar conjuntament els diferents aspectes que concorren en un problema determinat, com pot ser el cas de nous dispositius de mesura (Zimmerman 2006; Anon 2002; Liu et al. 2006; Picioeanu et al. 2010; Picioeanu et al. 2007).

Atès que aquest enfocament considera conjuntament diferents models teòrics preestablerts aïlladament, junt amb altres paràmetres obtinguts de forma empírica i no estrictament teòrica, diferenciem la modelització de la simulació. Així, la modelització, en endavant l'entendrem com el procés de descripció d'un model teòric que abasti un cert camp de la natura de forma concisa i refutable. Per contra, la simulació, l'entendrem com els processos de combinar diferents models teòrics preestablerts amb dades empíriques per aproximar o projectar uns resultats avaluable a problemes complexos (McLaughlin n.d.; Zimmerman 2006).

Això a banda, les noves possibilitats de càlcul disponibles han fet que es plantegi resoldre problemes complexos en què hi intervenen, de forma interconnectada, diferents aspectes de la natura. Aquest enfocament s'ha anomenat inicialment *multifísic* i en poden ser un exemple les previsions del canvi climàtic global, on es combinen aspectes astronòmics, climàtics, oceanogràfics o antròpics que actuen de forma relacionada i interdependent (Edenhofer & Seyboth 2013).

En el cas del present treball, es pretén simular, com a eina que faciliti el disseny, un sensor bioelectroquímic per a l'estimació ràpida de la càrrega orgànica continguda en mostres d'aigua o DBO (Demanda Biològica d'Oxigen). Per tant, la simulació inclourà fenòmens com:

**Físics:** models de transport de masses, models elèctrics, aspectes geomètrics o temperatura de treball.

**Químics:** processos de difusió per gradients de concentració, electroquímica a la superfície de l'elèctrode, interaccions entre espècies químiques o salinitat del medi.

**Biològics:** essencialment l'efecte del metabolisme en el consum o generació d'espècies químiques.

La major part d'aquests models responen a sistemes dinàmics, els elements dels quals intervenen en diversos dels processos en estudi, interconnectant-los de forma complexa. Així, en essència el model es basarà en una sèrie de problemes dependents del temps, calculat, per tant, per equacions diferencials, on els valors de les variables de l'equació dependran dels resultats d'altres equacions relacionades.

L'enfocament matemàtic que s'empra per resoldre aquest tipus de problemes és el de les derivades parcials (Zimmerman 2006; Godino Amado et al. 2010). Per resoldre sistemes de derivades parcials disposem de diferents mètodes matemàtics ben establerts com són el Mètode dels Elements Finitos (*Finite Element Method*, FEM), el Mètode de les Diferències Finites (*Finite Difference Method*, FDM) o el Mètode de Volums Finitos (*Finite Volume Method*, FVM), que seran més o menys adequats segons el tipus de problema que s'hagi d'afrontar (Ullah et al. 2015; Bihlo & Haynes n.d.).

En el nostre cas hem optat per utilitzar el paquet informàtic comercial de COMSOL Multiphysics (COMSOLab, Suècia) que utilitza el mètode dels elements finits (FEM) per resoldre sistemes d'equacions derivades parcials (PDE, *Partial Derivate Equations*). (Zimmerman 2006; Liu et al. 2006; Picioreanu et al. 2010).

### 3.2. MÈTODE UTILITZAT

El mètode FEM és una tècnica numèrica per resoldre sistemes d'equacions derivades parcials (Godino Amado et al. 2010). Primerament descrivim un domini geomètric que pot ser d'1, 2 o 3 dimensions; en el nostre cas (a part d'algunes aproximacions prèvies unidimensionals) la geometria escollida ha estat 2D perquè, d'una banda, l'ús de geometries 3D requereix una quantitat de càlcul que creix exponencialment i, de l'altra, el dispositiu projectat presenta diferències poc destacables en el tercer eix (z) ja que té un comportament que no difereix en aquesta dimensió. Per tant, resoldre models en 3D no ens representa una aportació destacable d'informació per obtenir uns resultats millors i, en canvi, incrementa molt el nombre d'elements i per tant els graus de llibertat del model, fet que implica un requeriment de càlcul molt més gran.

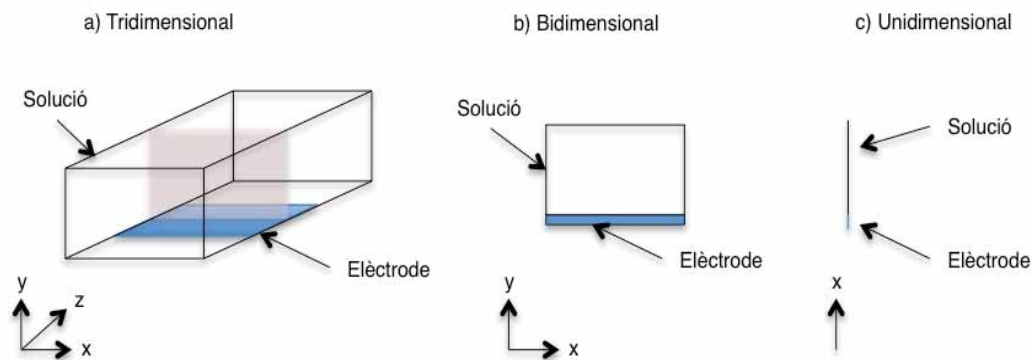


Figura 3.1. Representació esquemàtica del domini d'un elèctrode en un canal: a) Tridimensional, b) Bidimensional i c) Unidimensional (extret de (Godino Amado et al. 2010)).

Per al test s'han realitzat també models 3D del dispositiu, però sense exigir els mateixos nivells de precisió que en els models 2D.

Aquest domini geomètric aleshores s'ha discretitzat en subdominis molt menors, anomenats *elements finits* (Godino Amado et al. 2010); el conjunt d'aquests elements s'anomena *mallat* (Godino Amado et al. 2010), i cadascun dels vèrtex d'aquests elements s'anomena *node*, tot i que també podem trobar nodes fora dels vèrtex. El mètode FEM utilitzarà cadascun d'aquests nodes per realitzar el càlcul de les diferents variables que integren el model.

La dimensió dels elements vindrà, en part, determinada per la dimensió del model; així, en models 1D tindrem segments lineals, en 2D i 3D les geometries més simples ens donaran elements triangulars i tetraedres, respectivament (tot i que podem forçar altres geometries si ens convé (Godino Amado et al. 2010)). A les presents simulacions en 2D s'han utilitzat elements triangulars de segon ordre per fer la interpolació (Godino Amado et al. 2010).

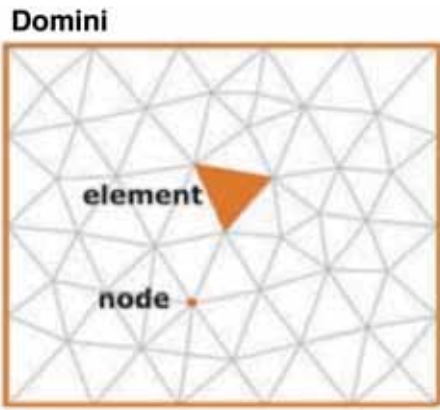


Figura 3.2. Esquema d'un mallat típic bidimensional, on s'utilitzen elements triangulars de segon ordre, definits per nodes a cadascun dels seus vèrtex. (Adaptat de Godino Amado et al. 2010))

Aquests elements no només defineixen la geometria, també es caracteritzen pels polinomis d'interpolació utilitzats per interpolat la solució a cada node, anomenats *funcions bassals*,  $\phi_i$ . La idea és aproximar la solució,  $u$ , utilitzant les funcions bassals i un determinat nombre de paràmetres finits o graus de llibertat (GdL o *Degrees of Freedom*, DoF). Aleshores, la solució es descriu així:

$$(3.1) \quad u = \sum_i u_i \phi_i$$

Aquests graus de llibertat ( $u_i$ ) són els valors de la solució a cadascun dels nodes. El polinomi d'interpolació  $\phi_i$  és 1 al  $i^{\text{è}}$  node, i 0 als altres nodes.

Així, l'exactitud de la solució depèn de l'ordre del polinomi d'interpolació, però a la vegada incrementa el requeriment de càlcul en el mateix ordre. Per exemple, una funció d'interpolació quadràtica requerirà la informació de 3 nodes (Godino Amado et al. 2010).

Un dels mètodes d'interpolació més comuns en FEM són els elements lagrangians, que utilitzen polinomis de Lagrange com a polinomis d'interpolació (Godino Amado et al. 2010; Dickinson et al. 2014). Aquests són de segon ordre i els que s'han utilitzat en els models que descriurem.

### 3.3. MODEL DESENVOLUPAT

El model desenvolupat té en compte fonamentalment tres fenòmens físics, químics i biològics entrelaçats, que són el transport de masses, la cinètica de la respiració d'oxigen per part dels bacteris i la cinètica de l'elèctrode.

A continuació es detalla l'enfocament amb què s'han treballat aquests diferents aspectes del model. Cal esmentar que en el model s'ha utilitzat una combinació de mòduls ja preestablerts en el paquet informàtic utilitzat (especialment els relacionats amb el transport de masses) i d'altres que en major o menor mesura s'han desenvolupat *ad hoc* per construir el model. Aquests darrers seran els que introduiran tant la cinètica de l'elèctrode com la del consum biològic de l'oxigen; hi entrarem en més detall per justificar-ne la construcció i la forma optada d'implementació en el model general.

#### 3.3.1. TRANSPORT DE MASSA

En el context del present treball, definim la transferència de massa com el transport d'una matèria d'una localització a una altra dins d'una solució (Godino Amado et al. 2010). Aquest transport el podem separar en 3 components principals segons la seva causa: migració, difusió i convecció. Aquests components que contribueixen al transport de massa total es poden representar com el sumatori de les diferents contribucions:

$$(3.2) \quad \vec{J}_{massa} = \vec{J}_{difusió} + \vec{J}_{convecció} + \vec{J}_{migració}$$

A continuació detallem aquests components que formen el transport de massa total i analitzem la rellevància que tindran per al dispositiu desenvolupat i la necessitat o no d'incloure'ls en les simulacions.

#### DIFUSIÓ

La difusió es defineix com el moviment microscòpic de matèria causat per un gradient de concentració (Folger n.d.; Godino Amado et al. 2010) on la matèria tendirà a circular des de les regions de concentració més elevada fins a les de concentració menor per assolir l'equilibri termodinàmic, que s'assolirà en la situació de mínima energia i, per tant, amb la total homogeneïtat. L'escala a la qual actua la difusió és, en conseqüència, microscòpica ja que depèn de les diferències de concentració. Podem descriure matemàticament la difusió a partir de les lleis de Fick, on es defineix el flux de matèria i la seva concentració en funció del temps i de la seva posició en l'espai (Folger n.d.). En el cas unidimensional, el flux d'una substància  $O$  es defineix com el nombre de mols que passen per un punt en l'espai per unitat de temps i per unitat d'àrea:

$$(3.3) \quad \frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 \cdot c = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

Aquesta equació (3.3) del flux es coneix com la primera llei de Fick, i el factor de proporcionalitat  $D$  és l'anomenat *coeficient de difusió* que es mesura en  $m^2 \cdot s^{-1}$ . D'altra banda, la segona llei de Fick ens permet de conèixer les variacions de la concentració en un punt de l'espai en funció del temps (Godino Amado et al. 2010) i s'expressa així:

$$(3.4) \quad \frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 \cdot c = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

El model s'ha implementat a partir de considerar tres situacions diferents, per la qual cosa s'han utilitzat tres subdominis amb les característiques següents:

- a) **Cambrà de reacció:** aquest és un element on no es considera el moviment del fluid, per la qual cosa l'única força rellevant que actua en el transport és la difusió en favor del gradient de concentració per a cadascuna de les espècies analitzades.
- b) **Membrana de separació:** en aquest subdomini es considera un medi saturat d'aigua (la membrana) però sense mobilitat, per la qual cosa s'ha utilitzat una aproximació similar a la descrita en el punt anterior, però amb la diferència que s'han modificat els coeficients de difusió per al diferents elements considerats en el model. Aquestes taxes o coeficients s'han extret de dades bibliogràfiques i de les caracteritzacions fetes pels mateixos fabricants de les membranes simulades. A l'apartat 2.4 s'expliquen i es justifiquen els valors considerats per als diferents paràmetres, així com la font d'on s'han extret.
- c) **Al canal electroquímico,** s'han utilitzat els mateixos valors del coeficient de difusió en medi aquós que en el punt a però amb la diferència que aquí estan directament acoblats a les forces de convecció, ja que es considera un flux continu d'un electròlit aquós saturat d'oxigen.

### CONVECCIÓ

La convecció es defineix com el moviment macroscòpic de "paquets" de dissolució (Folger n.d.). La podem subdividir en convecció natural, causada pel moviment provocat per gradients de temperatura, de pressió o de densitat dins de la solució, i la convecció forçada, que pot ser deguda tant al moviment del fluid per circulació o agitació com al moviment de l'elèctrode per agitació o vibració dins de la solució. Matemàticament podem definir el flux causat per la convecció per a una dimensió d'aquesta manera:

$$(3.5) \quad \vec{J}_{convecció} = \vec{v} \cdot c$$

On  $v$  és la velocitat amb la que es mou la dissolució (m/s) i  $c$  és la concentració de les diferents espècies (mol/m<sup>3</sup>). Les unitats de la convecció seran per tant mol/(m<sup>2</sup> · s).

Per tant, en el cas que menystinguem la migració per trobar-nos en un entorn en què la concentració d'electròlits difumini els camps elèctrics que es puguin generar i on la convecció no sigui rellevant, en el cas unidimensional, l'equació que defineix el transport de la matèria cap a l'elèctrode es regirà per la difusió tal com es descriu a l'equació 3.3.

Tot i això, podem considerar que el transport de fluids en canals micromètrics respon essencialment a un flux laminar, amb baixa incidència de fenòmens turbulents, com a resultat de les mateixes característiques dels sistemes microfluídics.

Una manera d'exemplificar-ho la trobem amb el nombre de Reynolds ( $Re$ ), que és un valor adimensional que permet predir quan un fluid es comportarà de manera laminar o turbulenta. El nombre de Reynolds es defineix com la ràtio entre les forces inercials i les viscoses, per a unes condicions donades, de manera que, quan les forces viscoses són dominants (nombres de Reynolds baixos), el fluid presentarà dinàmiques similars a diferents punts topogràfics i, per tant, respondrà a un moviment laminar. Per contra, si predominen les forces inercials, això pot donar lloc a diferències significatives en la dinàmica del fluid en punts topogràficament pròxims, és a dir, a moviments turbulents que els fan molt menys predictibles.

Si analitzem la fórmula proposada per Reynolds, trobem:

$$(3.6) \quad Re = \frac{\text{forces inercials}}{\text{forces viscoses}} = \frac{\rho v L}{\mu} = \frac{v L}{\nu}$$

On,  $v$  = velocitat del fluid (m/s),  $L$  = dimensió lineal o diàmetre hidràulic (m),  $\mu$  = viscositat dinàmica (kg/m·s),  $\nu$  = viscositat cinètica (m<sup>2</sup>/s) i  $\rho$  = densitat del fluid (kg/m<sup>3</sup>).

Així trobem que per a un líquid com l'aigua, en la qual la densitat i la viscositat es mantenen, la disminució del diàmetre hidràulic a les mides típiques de la microfluídica, sempre donarà nombres de Reynolds baixos que defineixen un moviment laminar del fluid i una nul·la o mínima participació de processos turbulents.

Això ens dóna un perfil de velocitats que es manté constant en el temps i permet utilitzar per a les simulacions les equacions de Navier-Stokes per a flux laminar de fluids newtonians incompressibles, en lloc de models més complexos que inclouen la possibilitat de formació de fluxos turbulents en el model.

$$(3.7) \quad \rho(u\nabla)u - \eta\nabla^2u + \nabla p = 0$$

$$(3.8) \quad \nabla \cdot u = 0$$

Aquesta fórmula només s'ha considerat en el subdomini que simula el canal electroquímic, i es pot obviar en els subdominis de la membrana i de la cambra de reacció, ja que no es considera que hi hagi fluxos d'aigua durant la simulació de l'experiment.

A més a més, el fet de poder considerar un model laminar presenta un gran avantatge de cara a la facilitat i requeriment de càlcul del model, ja que mentre els fluxos turbulents de fluids donen com a resultat possibles canvis oscil·latoris o caòtics en els fluxos locals a diferents punts del model, els models laminars amb una velocitat de fluxos constant permeten obtenir un resultat estable en el temps, un camp de forces constant que podem resoldre amb models estacionaris.

Posteriorment, hem utilitzat els resultats obtinguts d'aquests models estacionaris per a cadascuna de les velocitats de flux considerades com un valor fix que s'ha acoblat als models transitoris de la difusió, la reacció de consum d'oxigen i la cinètica de l'elèctrode.

Això significa un clar estalvi en els requeriments de càlcul del model alhora que facilita l'establiment d'unes condicions inicials que permetin iniciar els models de càlcul més complexos i acoblats.

## MIGRACIÓ

Definim la migració com el moviment de les partícules carregades sota l'efecte d'un camp elèctric (Compton & Banks n.d.; Cooper & Compton 1998; Godino Amado et al. 2010) i és, per exemple, el principal transport en les tècniques electroforèsiques. Així, per a un potencial elèctric  $\phi$  aplicat, el flux de ions de càrrega ( $z$ ), considerat en un cas unidimensional, pot ser descrit matemàticament com:

$$(3.9) \quad \vec{J}_{migració} = \frac{-zF}{RT} Dc\nabla\Phi$$

On:  $\Phi$  = Camp elèctric (V/m).

En la majoria d'experiments electroquímics, el transport de matèria causat per la migració pot ser considerat negligible, perquè les espècies en estudi es troben dissoltes en el si d'un electròlit o solució aquosa (en el nostre cas) amb concentracions relativament elevades de ions que permeten un bon transport elèctric i, per tant, dissipen la generació de camps elèctrics locals (Streeter & Compton 2008).

Aquestes forces seran sobretot importants en condicions en les quals hi hagi poques espècies carregades en el si de la mescla aquosa, ja que es poden donar camps que afavoreixin o limitin el transport d'altres espècies carregades tot i la tendència donada per la convecció i sobretot per la difusió (Limon-Petersen et al. 2009). Pel que fa al modelat, és un aspecte que presenta diferents problemes per als models més relacionats amb les diferències de velocitat i/o distàncies entre els diversos paràmetres considerats que per la complexitat matemàtica inherent que presenten.

En el cas estudiat s'ha considerat que hi ha 2 factors que permeten limitar aquest problema: a) es preveu l'anàlisi de mostres amb certa càrrega de compostos (com pot ser una aigua residual); b) no hi ha cap incompatibilitat amb l'ús d'electròlits afegits i neutres respecte les reaccions considerades.

Considerar aquestes forces implica problemes matemàtics de cara a la resolució dels models, principalment relacionats amb els canvis d'escala en la distància i la velocitat, en relació amb els altres elements modelats (la mida dels camps elèctrics es pot situar en l'escala dels nanòmetres en comparació amb les micres o fins i tot mil·límetres d'altres elements i la velocitat és quasi instantània).

Així, en els models s'han considerat els efectes de la migració elèctrica com a negligibles. Això ha permès evitar l'ús les fórmules que contempnen la migració, que introdueixen una alta inestabilitat a la simulació.

### 3.3.2. CINÈTICA DE L'ELÈCTRODE

Com s'ha comentat a la introducció, el mètode analític escollit és l'electroquímic. A continuació detallarem les principals característiques d'aquest mètode.

#### DETECCIÓ ELECTROQUÍMICA

La detecció electroquímica es caracteritza, en la seva forma més comuna, per l'estudi de la transferència d'electrons entre un elèctrode i les espècies químiques presents en una solució (Compton & Banks n.d.; Godino Amado et al. 2010; Godino et al. 2008). Aquesta detecció pot donar-se tant entre reaccions químiques provocades pel pas d'un corrent elèctric (o l'aplicació d'un determinat potencial elèctric a un elèctrode) en les aplicacions electroanalítiques com en la generació d'una energia elèctrica a partir de reaccions químiques en les aplicacions de cèl·lules de combustible (Allen & Bard 2001).

Els materials més freqüents dels elèctrodes són metalls (Au, Pt, Cu, Hg), semimetalls com diferents compostos de carboni (grafit, grafè o carboni vitrificat) i semiconductors (Ordeig et al. 2007; Godino Amado et al. 2010), i l'elecció d'un d'aquests materials dependrà de l'aplicació projectada i la disponibilitat tècnica per a l'ús dels diferents materials i els mètodes de producció disponibles.

La fase líquida pot ser amb base aquosa o no, però en qualsevol cas haurà de contenir espècies iòniques (o carregades) per tal de garantir una bona conductivitat i evitar problemes de migració elèctrica en el corrent, o el que coneixem com a electròlit. L'electròlit, idealment, haurà de ser el més inert possible per tal de no interferir en les reaccions que es donin entre l'anàlit a estudiar i l'elèctrode.

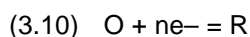
El ritme del procés electroquímic tindrà bàsicament 3 factors determinants: les cinètiques de la superfície de l'elèctrode, les reaccions químiques al si (*bulk*) de l'electròlit i els processos de transport de massa entre ambdós.



En les diferents simulacions i experiments endegats dins d'aquesta tesi, s'han utilitzat microelèctrodes de banda de diferents materials i solucions d'electròlits de composició aquosa.

### BASES D'ELECTROQUÍMICA

El procés electroquímic es representa típicament amb parells de reducció com:



Aquí O és una espècie química en estat oxidat,  $ne^-$  és el nombre d'electrons implicats per molècula i R és l'espècie química reduïda, i formen en conjunt el parell redox. Assumim que el material de l'elèctrode conté una alta densitat d'estats electrònics que formaran les bandes de conducció elèctrica; aleshores, la mitjana d'energia dels electrons es trobarà al voltant del nivell de Fermi,  $E_F$ . Ara hi podem aplicar un nivell d'energia determinat, per mitjà d'un potenciòstat per tal d'aproximar-lo al nivell de l'HOMO o del LUMO de l'espècie química que es vol oxidat o reduir mitjançant l'aplicació d'un potencial elèctric extern, de manera que permeti la injecció o extracció d'electrons al conductor que compon l'elèctrode (Compton & Banks n.d.; Cooper & Compton 1998; Godino Amado et al. 2010) i generi, en conseqüència, un corrent elèctric mesurable i proporcional al nombre de molècules que s'hagin oxidat o reduït. A la figura 3.3 trobem un esquema dels processos d'oxidació a i reducció b:

Totes les reaccions químiques necessiten superar una barrera energètica per poder-se donar, l'energia lliure d'activació estàndard  $\Delta G^{++}$  (Godino Amado et al. 2010). El punt en el qual l'energia requerida és màxima es coneix com l'estat de transició o el *complex activat* (Atkins 2002).

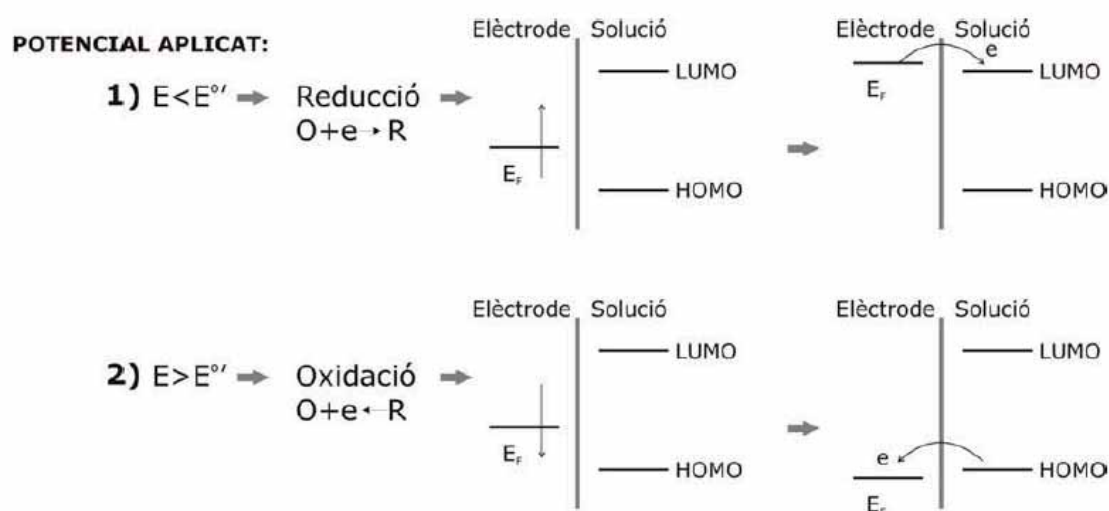


Figura 3.3. Esquema de la reducció i oxidació en funció del potencial elèctric aplicat a l'elèctrode.

Aquí s'observa com, partint del nivell energètic propi del conductor que forma l'elèctrode (o nivell de Fermi)  $E_F$ , aquest es pot modificar mitjançant l'aplicació d'un potencial extern que permet que arribi bé a l'anomenat LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) o HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) de l'espècie redox i, per tant, formar el complex activat que doni lloc a la seva oxidació o reducció, respectivament (Atkins 2002). Això permet que a la cel·la electroquímica s'hi donin tant les reaccions de reducció com les d'oxidació, en funció del potencial que apliquem a l'elèctrode.

Les cel·les electroquímiques que hem utilitzat es controlen mitjançant l'ús d'un potenciòstat extern que permet aplicar potencials elèctrics coneguts a l'elèctrode de treball.

L'**elèctrode de treball** és aquell elèctrode d'un sistema electroquímic en el qual es dona la reacció que ens interessa. Si aquesta reacció és una reducció (com és el nostre cas), l'anomenem *catòdic*. Si és una oxidació, l'anomenarem *anòdic*.

Un **elèctrode auxiliar** o contraelèctrode tanca el circuit i permet el pas de corrent entre l'elèctrode de treball i el medi analitzat per tal de mesurar-ne els corrents que hi circulen.

Un **elèctrode de referència**, situat en contacte amb el mateix electròlit, i pel qual no passa corrent, serveix com a referència per als elèctrodes de treball i contraelèctrode per tal de mesurar i controlar el potencial de l'elèctrode de treball.

Per a aquest elèctrode de referència s'han utilitzat dues configuracions: a) utilitzar un elèctrode d'igual composició que l'auxiliar i el de treball, microfabricat al mateix canal de mesura, i b) utilitzar un elèctrode de referència estàndard ben conegut AgCl/Ag (Allen & Bard 2001), separat del canal de mesura, però amb continuïtat de conductivitat elèctrica amb la zona de mesura i en contacte amb el mateix electròlit.

Tots els resultats que es presentaran responen a aquesta segona configuració, ja que en proves preliminars es va considerar que eren de millor qualitat i generaven menys soroll en les mesures preses.

En aquest treball s'han utilitzat principalment dues tècniques electroanalítiques, que són:

(Crono)Amperometria: és una tècnica estàtica en què apliquem un potencial conegut que afavoreixi bé la reducció o l'oxidació de l'espècie redox en estudi, durant un període de temps, mentre en mesurem la concentració de O o R generat pel procés redox en estudi (figura 3.5)

Voltamperometria: dins d'aquest grup, que inclou una gran varietat de tècniques electroquímiques, hem utilitzat principalment la voltametria cíclica, que és una tècnica en què apliquem a l'elèctrode un potencial variable en el temps que permeti fer un cicle complet d'oxidació-reducció (per exemple, reducció-oxidació-reducció). Aquesta tècnica permet comprovar la reversibilitat de la reacció redox i analitzar altres paràmetres rellevants de l'experiment (figura 3.4).

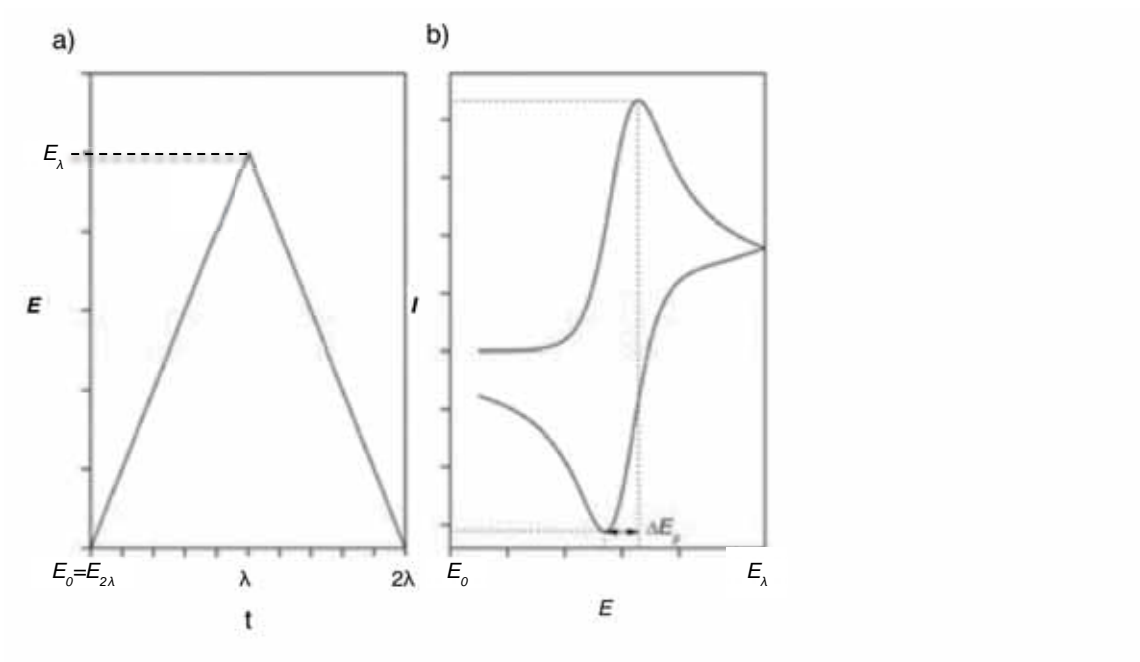


Figura 3.4. a) En la voltametria cíclica apliquem un canvi de potencial a l'elèctrode per reduir i oxidar l'espècie objectiu. b) El corrent resultat mostrarà un perfil similar a aquest, respecte al potencial aplicat, a un experiment amb flux.  $\lambda$  és el potencial d'interrupció de l'ona de potencial.

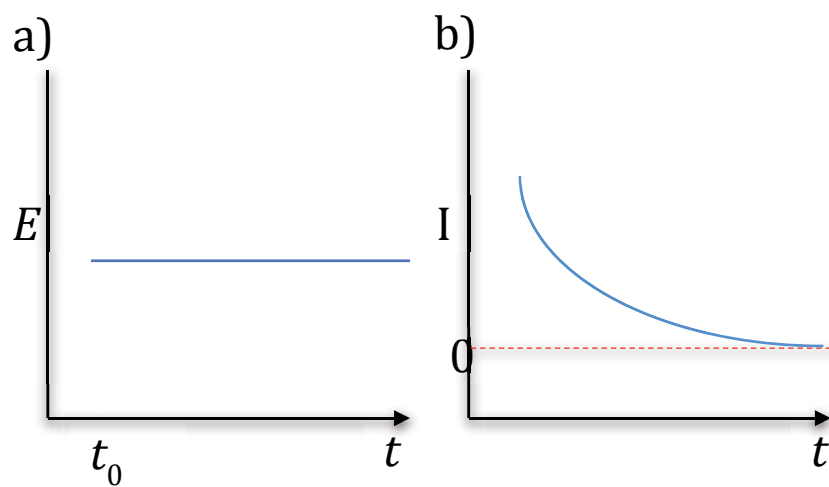


Figura 3.5. a) En el cas de la cronoamperometria apliquem un potencial constant per situar l'elèctrode al potencial LUMO de l'espècie objectiu de l'anàlisi, en el nostre cas l'oxigen. b) La resposta del corrent obtingut serà proporcional a la reacció que tingui lloc a l'elèctrode i, per tant, a la concentració de l'espècie objectiu (a l'exemple, un consum en el temps).

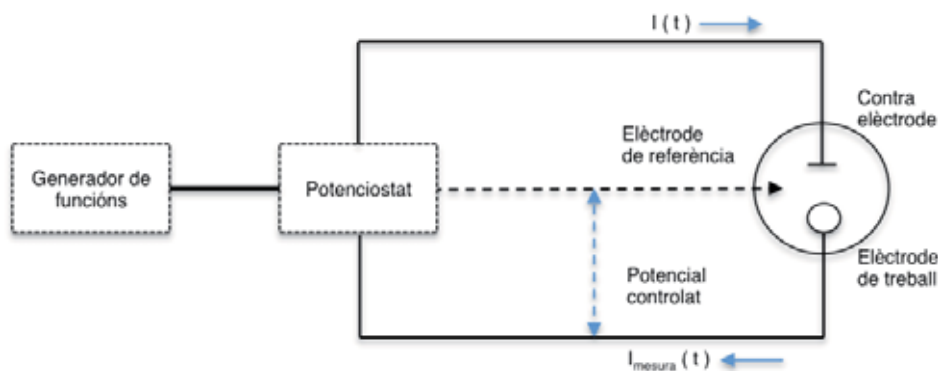


Figura 3.6. Esquema d'una cèl·lula electroquímica. Consisteix en un conjunt de tres elèctrodes (treball, contra i referència) connectats a un potenciostat.

Per convenció, al llarg de la tesi utilitzarem la recomanació de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), que considera positius els corrents corresponents a les oxidacions (l'elèctrode actua com a embornal) i negatius els del procés de reducció (l'elèctrode actua com a font d'electrons).

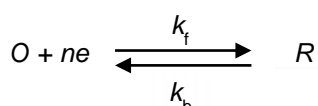
Existeix una relació entre el potencial elèctric ( $E$ ) i les concentracions relatives de les espècies electroactives,  $[O]$  i  $[R]$  a la superfície de l'elèctrode, que descriu l'equació de Nernst:

$$(3.11) \quad E = E^{\circ} + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln \left( \frac{[O_{\text{elèctrode}}]}{[R_{\text{elèctrode}}]} \right)$$

On  $E^{\circ}$  és el potencial formal del parell redox a l'equilibri,  $R$  és la constant dels gasos ideals ( $8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $F$  és la constant de Faraday ( $96.485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $n$  és el nombre d'electrons intercanviats pel parell redox i  $T$  és la temperatura absoluta en graus Kelvin.

#### REACCIONS A LA SUPERFÍCIE DE L'ELÈCTRODE: MODEL DE BUTLER I VOLMER

En aquest treball assumirem el model cinètic de Butler i Volmer per a transferències heterogènies d'electrons (Allen & Bard 2001). Així, partint d'una reacció redox típica, diferenciem la velocitat de reducció ( $k_f$ ) de la d'oxidació ( $k_b$ ):



(3.12)

On  $k_f$  i  $k_b$  són les constants de transferència cinètica d'electrons respectivament. La velocitat de la reacció es definirà com el canvi de massa per unitat de temps i àrea de l'elèctrode ( $\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Tant el ritme de reducció ( $V_f$ ) com el d'oxidació ( $V_b$ ) són de primer ordre i per tant dependran linealment de la concentració:

$$(3.13) \quad V_f = k_f \cdot [O]$$

$$(3.14) \quad V_b = k_b \cdot [R]$$

El corrent observat es definirà, doncs, com la diferència entre el flux de corrent catòdic (reducció) i anòdic (oxidació):

$$(3.15) \quad j = nF(V_f - V_b) = nF(k_f[O] - k_b[R])$$

Podem calcular l'efecte que té el potencial elèctric aplicat sobre les constants cinètiques  $k_f$  i  $k_b$  en funció dels canvis en la barrera de l'energia lliure de Gibbs (Allen & Bard 2001). Així, les constants cinètiques es poden expressar seguint la fórmula d'Arrhenius:

$$(3.16) \quad k_f = A_f e^{-\Delta G_c^\ddagger / RT}$$

$$(3.17) \quad k_b = A_b e^{-\Delta G_a^\ddagger / RT}$$

L'aplicació d'un potencial elèctric a un elèctrode implica un canvi en el nivell de Fermi dels electrons del metall o conductor que formen l'elèctrode, i podem interpretar aquesta variació com un canvi en la barrera d'energia lliure d'activació de la reacció química (Godino Amado et al. 2010).

A l'equilibri, les energies d'activació catòdica i anòdica són iguals ( $\Delta G_{0a}^{\ddagger} = \Delta G_{0c}^{\ddagger}$ ) i, per tant, la probabilitat de transferir un electró és la mateixa en ambdues direccions. Fora de l'equilibri, la variació de potencial modifica el nivell energètic dels electrons de l'elèctrode i provoquen que o bé l'oxidació o bé la reducció sigui més favorable (Godino Amado et al. 2010). Els valors d'energia lliure d'activació varien en funció del canvi energètic global, i es poden escriure com:

$$(3.18) \quad \Delta G_a^\ddagger = \Delta G_{0a}^\ddagger - (1 - \alpha)nF(E - E^{0'})$$

$$(3.19) \quad \Delta G_c^\ddagger = \Delta G_{0c}^\ddagger + \alpha nF(E - E^{0'})$$

On  $\alpha$  és el coeficient de transferència de càrrega i té un valor entre 0 i 1 i dóna una idea de la posició del complex d'activació respecte de les espècies  $O$  i  $R$ . En processos de transferència electrònica simple, com amb els metalls, el valor de  $\alpha$  està al voltant de 0,5 (Wang 2000), essent similarment favorable el procés de reducció i oxidació. En el cas de la reducció i l'oxidació de l'oxigen que es treballa en aquesta reacció, on estan implicats dos electrons que no es transfereixen simultàniament, sinó consecutivament ( $O_2 \rightarrow OH+1e+ \rightarrow O_2+2e$ ), això no deixa de ser una certa simplificació, per a una explicació més detallada vegeu (Menshykau et al. 2011).

Partint de les equacions 3.18 i 3.19, per a les energies d'activació, podem expressar les constants cinètiques com:

$$(3.20) \quad k_f = k_f^0 e^{-\alpha nF(E-E^{0'})/RT}$$

$$(3.21) \quad k_b = k_b^0 e^{(1-\alpha)nF(E-E^{0'})/RT}$$

On:

$$(3.22) \quad k_f^0 = A_f e^{-\Delta G_{0c}^\ddagger / RT}$$

$$(3.23) \quad k_b^0 = A_b e^{-\Delta G_{0a}^\ddagger / RT}$$

En condicions d'equilibri, trobarem que  $k_f^0 = k_b^0 = k^0$  on  $k^0$  o  $k_s$  és el que coneixem com a constant de velocitat estàndard. Un procés de transferència electrònica serà, doncs, reversible quan  $k_s = >1$  i irreversible quan tendeix a zero. El cas analitzat de la reducció i oxidació de l'oxigen és un procés reversible (Godino Amado et al. 2010).

En considerar les expressions (3.19) i (3.20), el concepte de constant de velocitat estàndard ( $k_s$ ) i introduir-les a l'expressió (3.15), podem descriure la densitat de corrent en funció del potencial elèctric aplicat:

$$(3.24) \quad j = nfk^0 \left( [O]e^{-\alpha \frac{nF}{RT}(E-E^0')} - [R]e^{(1-\alpha) \frac{nF}{RT}(E-E^0')} \right)$$

En aquest cas, podem analitzar la situació en equilibri, quan les reaccions d'oxidació i reducció són iguals i, per tant,  $j$  és igual a zero:

$$(3.25) \quad nFk^0 [O]e^{-\alpha \frac{nF}{RT}(E-E^0')} = nFk^0 [R]e^{(1-\alpha) \frac{nF}{RT}(E-E^0')}$$

D'altra banda, el potencial que s'assoleix a l'elèctrode dependrà de les concentracions de la dissolució ( $[O]_0$ ,  $[R]_0$ ) i es poden relacionar mitjançant l'equació de Nernst:

$$(3.26) \quad E_{eq} = E^0' + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O]_0}{[R]_0}$$

A partir d'aquí podem, doncs, definir la densitat de corrent d'intercanvi  $j_0$  així:

$$(3.27) \quad j_0 = nFk^0 [O]_0^{1-\alpha} [R]_0^\alpha$$

Això ens permet treballar en relació amb la densitat de corrent d'intercanvi  $j_0$  en lloc de la velocitat estàndard  $k^0$ , i podem expressar la densitat de corrent en termes de desviació de potencial respecte de l'equilibri. D'aquesta manera obtenim el concepte de *sobrepotencial*, ( $\eta$ ):

$$(3.28) \quad \eta = E - E_{eq}$$

I podem reescriure l'equació (2.13) com:

$$(3.29) \quad j = j_0 \left( \frac{[O]}{[O]_0} e^{-\alpha \frac{nF}{RT}\eta} - \frac{[R]}{[R]_0} e^{(1-\alpha) \frac{nF}{RT}\eta} \right)$$

Aquesta relació entre la densitat de corrent, les concentracions del parell redox i el potencial aplicat es correspon amb el model de Butler i Volmer per a reaccions a la superfície de l'elèctrode.

$$(3.30) \quad i = nFj_{difusió} = -nFD \left. \frac{\partial [c(x,t)]}{\partial x} \right|_{x=\text{elèctrode}}$$

Aquest model de Butler i Volmer es basa en conceptes macroscòpics de la termodinàmica clàssica (Allen & Bard 2001), i tot i que no permet un estudi de la transferència de càrrega a l'àmbit molecular de les espècies electroactives o del material de l'elèctrode, no s'ha considerat necessari utilitzar els models moleculars per a l'abast del present treball.

### 3.3.3. REACCIONS QUÍMIQUES ACOBLADES

A fi i efecte de simular el comportament de la biomassa en el si del dispositiu, que és la que utilitzarà l'oxigen dissolt present en el medi per degradar aeròbiament la matèria orgànica present, s'han introduït una sèrie de fórmules per tal de representar-lo en les simulacions.

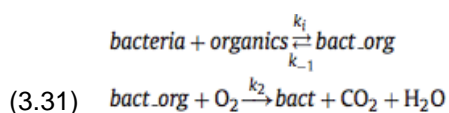
D'una banda, a tot el model s'ha assumit que el medi és homogeni, i conseqüentment que no hi ha presència de sòlids en suspensió. Això, a part de facilitar el modelat, és compatible amb una mostra que tingui un pretractament de filtrat.

Aquest pretractament es preveu necessari també en termes d'assegurar un bon transport de la mostra en un sistema microfluídic, en el qual petits volums de sòlids podrien obturar o alterar les velocitats de flux en el sistema, que són clau per a les estimacions posteriors de concentracions d'oxigen per tal d'obtenir el resultat.

En un altre àmbit, a part que els resultats s'expressin en termes de mgDBO/ml, no hem de considerar que les mesures siguin directament equivalents a les obtingudes per altres mètodes analítics com la DBO<sub>5</sub> estàndard, a causa del menor temps analític i als canvis en altres paràmetres com l'ús de mescles concentrades de microorganismes (Anon 2002)).

En qualsevol cas també és habitual en la metodologia estàndard de la DBO<sub>5</sub> fer i utilitzar procediments analítics diferents segons la informació que es cerca com la DBO<sub>5</sub> estàndard i la DBO<sub>5</sub> filtrada per diferents motius (per exemple, diferenciar l'aigua crua influent a una EDAR de la resultant del pretractament que inclou processos de decantació, o aproximar la diferència entre DBO total i de ràpida degradació).

Per una altra banda, hem considerat un mecanisme de degradació de la matèria orgànica en dues fases que respon a un mecanisme de tipus Michaelis-Menten en el qual, en un primer pas, s'assoleix un equilibri entre la biomassa microbiana i la matèria orgànica present en solució i, posteriorment, capta l'oxigen per descompondre aquesta matèria en CO<sub>2</sub> i aigua, com es mostra a la fórmula següent:



En la qual, *bact* és el nombre de cèl·lules bacterianes sense compostos orgànics reduïts adherits o al citosol; *organics* és el nom arbitrari que donem al model a la variable que defineix la quantitat de matèria orgànica present, en funció de l'oxigen requerit per a la seva descomposició aeròbica; *bact\_org* representa les cèl·lules bacterianes en contacte amb la matèria orgànica reduïda, i *k*<sub>1</sub> i *k*<sub>-1</sub> són els ritmes cinètics de la reacció endavant i endarrere respectivament. *k*<sub>2</sub> és el ritme cinètic de respiració, que és irreversible, i O<sub>2</sub> és la quantitat d'oxigen present; CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O són els productes finals de la reacció.

Tot i acceptar que això implica una gran simplificació dels processos que realment es donen, a efectes pràctics és suficient per al propòsit de la simulació del disseny d'un microsystema.

Cal esmentar, com es pot deduir de l'explicació anterior, que atès que la DBO en si ja és una mesura indirecta de la matèria orgànica present en una mostra, que es fa a partir de l'estimació de l'oxigen requerit per a la seva degradació aeròbica; i que com s'ha comentat en la introducció, aquesta mesura no inclourà la matèria orgànica que requereixi més que el temps de durada de l'experiment per a la seva degradació, en els models quan parlem de DBO ens referim a aquella matèria orgànica aeròbiament degradable entesa com una concentració molar d'oxigen o, dit amb més exactitud, de l'oxigen requerit per a degradar-la completament.

Aquesta reacció només es dona a la cambra de reacció ja que no hi ha d'haver transport de la biomassa a través de la membrana i, per tant, la biomassa tampoc és present al canal de l'electròlit.

Els sistemes de procés de fangs activats, especialment els que es refereixen a la respiració aeròbica, han estat àmpliament tractats i descrits en la literatura; volem destacar, però, els treballs de Spanjers et al. (Process 2011; Maoyu 1990; Yasukawa et al. 2010; Basant et al. 2010; Picioreanu et al. 2010; Picioreanu et al. 2007).

L'aproximació en estat estacionari dels mecanismes descrits ens du a les següents equacions de velocitat respecte a les reaccions de l'oxigen i a la matèria orgànica:

$$(3.32) \quad \frac{dO_2}{dt} = \frac{-k_1 \cdot k_2 \cdot Bact_0 \cdot Organics \cdot O_2}{k_{-1} + k_2 O_2 + k_1 Organics}$$

i

$$(3.33) \quad \frac{dOrganics}{dt} = Bact_0 \cdot Organics \left\{ \frac{k_1 (k_1 Organics + k_{-1})}{k_{-1} + k_2 O_2 + k_1 Organics} - k_1 \right\}$$

En aquestes equacions,  $Bact_0$  és la concentració inicial de bacteris. Cal esmentar que els valors de  $k_1$ ,  $k_{-1}$  i  $k_2$  han estat escollits de forma arbitrària.



### 3.4. PARÀMETRES I VALORS UTILITZATS

Per construir el model s'han hagut d'escollir una sèrie de paràmetres i valors per tal de poder definir-lo prou com per fer les simulacions. Alguns d'aquests valors eren coneguts o aproximats de valors experimentals previs, mentre que d'uns altres en teníem una minsa informació prèvia.

A la taula següent es resumeixen els paràmetres i valors utilitzats per als principals models, s'hi defineixen els models en què s'han utilitzat i les fonts utilitzades per a la seva definició.

Als punts posteriors entrarem en més detall justificar les eleccions fetes respecte a aspectes com la geometria, el transport de matèria, el ritme de respiració biològica o el modelat electroquímic.

Paràmetres i valors utilitzats en els models					
Paràmetre	Descripció	Valor			Unitats
		Efectes m <sup>a</sup>	Reacció <sup>b</sup>	Elèctric <sup>c</sup>	
<b>Geometria</b>					
$h^1$	Alçada de la cambra de reacció	50	50	50-100	10 <sup>6</sup> m
$h^2$	Gruix de la membrana	25-75-200	25	25	10 <sup>6</sup> m
$h^3$	Alçada del canal de l'electròlit	50	50	50-100-150	10 <sup>6</sup> m
L	Longitud total	0,13	0,05	0,05	m
W	Amplada del canal	500	500	500	10 <sup>6</sup> m
<b>Transport de masses</b>					
$V_m$	Velocitat mitjana del fluid	40	4-8-12-16	16	10 <sup>-4</sup> m/s
T	Temperatura	293,2	293,2	293,2	K
Sal	Salinitat	5	5	5	Ka/m <sup>3</sup>
Sat	Saturació d'oxigen <sup>d</sup>	0,5631	0,5631	0,5631	mol/m <sup>3</sup>
$c_{O_2\_Chan}$	Concentració inicial d'oxigen al canal	Sat	Sat	Sat	mol/m <sup>3</sup>
$c_{O_2\_rc}$	Concentració inicial d'oxigen a la cambra de reacció	0	0	0	mol/m <sup>3</sup>
$c_{O_2\_BOD}$	Concentració inicial DBO a la cambra de reacció	-	30-300-3000	300	a/m <sup>3</sup>
$D_{O_2\_w}$	Coefficient de difusió de l'oxigen a l'aigua	3,5x10 <sup>9</sup>	3,5x10 <sup>9</sup>	3,5x10 <sup>9</sup>	m <sup>2</sup> /s
$D_{O_2\_m}$	Coefficient de difusió de l'oxigen a la membrana (PDMS)	3,5x10 <sup>9</sup>	3,5x10 <sup>9</sup>	3,5x10 <sup>9</sup>	m <sup>2</sup> /s
	Coefficient de difusió de l'oxigen a la membrana (PTFE)	0,015x10 <sup>9</sup>	-	-	m <sup>2</sup> /s
$D_{BOD\_w}$	Coefficient de difusió de la DBO a l'aigua	-	1x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>9</sup>	m <sup>2</sup> /s
$D_{BOD\_m}$	Coefficient de difusió de la DBO a la membrana	-	0	0	m <sup>2</sup> /s
<b>Reaccions</b>					
bact	Concentració de bacteris	-	1x10 <sup>-15</sup>	1x10 <sup>-15</sup>	cel./m <sup>3</sup>
cons <sub>bact</sub>	Ritme màxim de respiració pels bacteris	-	1,04167x10 <sup>-16</sup>	1,04167x10 <sup>-16</sup>	mol O <sub>2</sub> /s
$k_1$	Constant endavant (forward) de l'equació 3.31a	-	1x10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>-5</sup>	1/s
$k_{-1}$	Constant endarrera (backward) de l'equació 3.31a	-	5x10 <sup>-2</sup>	5x10 <sup>-2</sup>	1/s
$k_2$	Constant endavant (forward) de l'equació 3.31b	-	1,25x10 <sup>6</sup>	1,25x10 <sup>6</sup>	1/s
<b>Model elèctric</b>					
$C_{O_2\_R}$	Concentració inicial de R al canal de l'electròlit	-	-	1x10 <sup>-7</sup>	mol/m <sup>3</sup>
n	Nombre d'electrons a la reacció	-	-	1	
$E_0$	Potencial estàndard	-	-	0	V
$D_{R\_w}$	Coefficient de difusió de R a l'aigua	-	-	3,5x10 <sup>9</sup>	m <sup>2</sup> /s
ks	Constant de transferència electrònica	-	-	1	m/s
$\alpha$	Coefficient de transferència de càrrega	-	-	0,5	
$E_{eq}$	Potencial d'equilibri O/R	-	-	0,3926	V
$J_0$	Densitat de vescanvi de corrent	-	-	2,373x10 <sup>-5</sup>	A/m <sup>2</sup>

Taula 3.1. Paràmetres i valors utilitzats en el model (Corregir i ampliar del paper, hi tens apuntats alguns errors importants!).

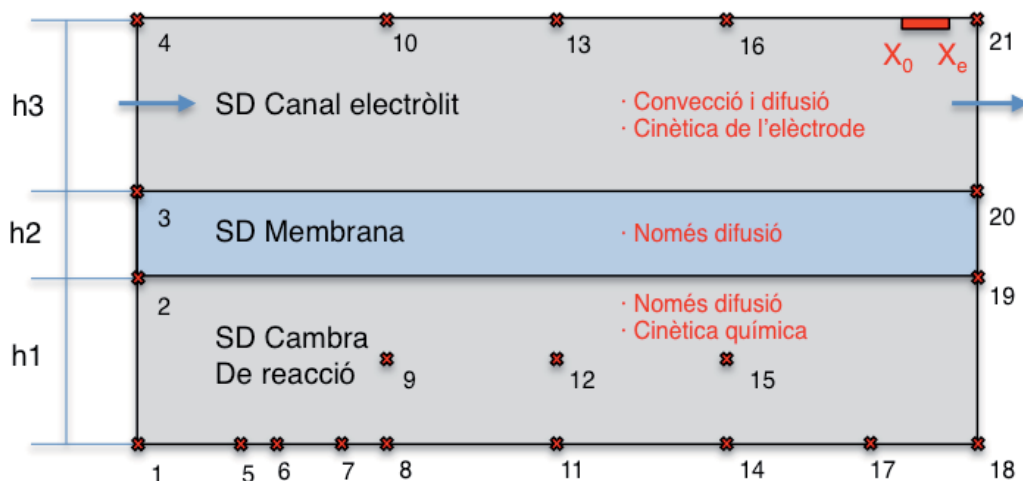


Figura 3.7: Esquema bidimensional del dispositiu.

### 3.4.1. GEOMETRIA DEL SISTEMA

Molts dels valors escollits en referència als aspectes geomètrics del model són en principi arbitraris, tot i que dins d'un marc plausible definit per diversos factors. Entre ells, per exemple, podem esmentar:

- Amplada dels canals (de 1.000 a 500 micres): ve en bona part determinada per la precisió esperada dels mètodes de fabricació disponibles en el moment de construir les simulacions.
- Gruix de la membrana: el valor d'aquest paràmetre ve constret per les membranes comercials que hi hagi disponibles, alhora que pels resultats de les simulacions prèvies preparatòries.
- Alçada del canal de l'electròlit: aquest aspecte s'ha considerat en funció d'un dels gruixos disponibles de les membranes a partir de les quals es gravaven els canals. Cal esmentar, però, que cap a les darreres simulacions, quan ja es considerava el consum d'oxigen causat pel funcionament de l'elèctrode, es va observar que aquest podia arribar a consumir una bona part de l'oxigen disponible, per la qual cosa es van fer simulacions amb majors alçades del canal per avaluar-ne l'efecte.
- Alçada de la cambra de reacció: en aquest cas el principal limitant teòric previ era el fet d'assegurar-nos que hi hagués un transport per difusió de l'oxigen prou ràpid com per garantir que cap part de la cambra es trobaria en condicions anaeròbiques o microaeròbiques que condicionessin la biomassa a activar els enzims de degradació anaeròbica (Godino et al. 2008). Es realitzaren diferents models simplificats previs per tal de definir-ne els límits.  
Aquest valors depenen també de la concentració de matèria orgànica present a la mostra, de la difusibilitat de l'oxigen a través de la membrana i de la quantitat d'oxigen introduït en el sistema, que es controla mitjançant el cabal d'electròlit saturat d'oxigen introduït al sistema.
- Longitud dels canals: es va aproximar a partir de models inicials de longitud molt més grans de les estimades necessàries (tendents a l'infinit) i es va avaluar el comportament tant de la concentració de l'oxigen (per esgotament) com de la matèria orgànica.

Potser és rellevant comentar en aquest punt que aquesta és una de les grans virtuts de l'aproximació al disseny a partir de simulacions, ja que amb un reajustament curós de les

condicions s'han pogut obtenir uns resultats previs que combinats amb el coneixement experimental i teòric del problema han permès de definir, reajustar i comparar diferents solucions de manera ràpida i abans d'entrar en processos de fabricació o validació experimental.

### 3.4.2. COMPOSICIÓ DEL MEDI I TRANSPORT DE MASSES

En aquest apartat es disposa de molta més informació bibliogràfica i acceptada per tal de definir els valors dels paràmetres.

Tot i això hi ha alguns comentaris que poden ser pertinents per a altres informacions més arbitràries o de les quals no es disposa de tanta documentació.

#### **Transport:**

- a) Velocitat mitjana del flux: aquesta velocitat ve determinada pel cabal influent de l'electròlit saturat d'oxigen i les dimensions d'alçada i amplada del canal. Els valors es van anar reajustant al llarg del procés de modelat del sistema, però en si la velocitat mitjana del flux són uns valors que dins d'un rang lògic és arbitrari.

Cal esmentar que la velocitat de flux determinarà sobretot el comportament hidrodinàmic del medi aquós, determinant les velocitats màximes puntuals i àdhuc si el comportament d'aquest respondrà a fluxos laminars o hi poden aparèixer fenòmens turbulents. Limitar la formació de turbulències i limitar les resistències al transport hidràulic en el dispositiu serà clau en termes de garantir que es coneix la quantitat d'aigua en contacte o a la proximitat de l'elèctrode per unitat de temps, que serà imprescindible per tal de poder extrapolar les concentracions a partir dels valors de reducció obtinguts.

En tot cas, la velocitat de flux és fàcilment regulable durant els experiments, mitjançant la modificació del cabal influent al sistema. D'altra banda aquest cabal serà proporcional al total d'oxigen dissolt introduït al dispositiu, per la qual cosa, dins d'un llindar màxim i mínim de cabal, es disposarà d'un sistema regulable i adaptable en funció de la concentració de matèria orgànica a l'anàlisi, molt esquemàticament, a altres concentracions que puguin esgotar l'oxigen present (lectures inferiors a 0,05 mM): es pot incrementar el cabal o, per contra, davant de mostres molt diluïdes, es pot reduir el cabal a fi de millorar el senyal obtingut del sensor.

- b) Difusió a través de les membranes: en ambdós casos, tant per a les membranes de composició de PDMS com per a les de PTFE, és difícil de trobar valors ben determinats de la difusió d'oxigen a través seu. Hem utilitzat diferents fonts bibliogràfiques que hi feien referència però amb valors molt diferents per a condicions en principi similars. S'ha optat per utilitzar com a paràmetre de disseny una mitjana dels valors bibliogràfics, però exclouent certs valors extrems que no semblaven massa lògics. Les referències a partir de les quals s'ha estimat el valor utilitzat són per al PDMS (Cox & Dunn 1986; Evans & Quinton 1978) i per al PTFE (Clochard et al. 2010; Evans & Quinton 1978; Lehtinen et al. 1998).

- c) Difusió de la DBO en medi aquós: en aquest cas ens trobem amb dos aspectes molt diferenciats que cal comentar:

1. Difusió en medi aquós: no disposem de dades d'aquest valor. A més a més, com s'ha comentat en punts precedents, el concepte de DBO emprat aquí no respon a una realitat natural sinó a un cert nombre de simplificacions i extrapolacions lògiques. Davant d'això s'ha optat per un valor que fos inferior a la velocitat de difusió de l'oxigen, optant per reduir-la en un factor de 3,5.

2. Difusió a través de la membrana: idealment, i així es contempla en el model, la difusivitat de la matèria orgànica a través de la membrana ha de ser igual a zero. Si bé és cert que per a la majoria de compostos això es correspondrà amb la realitat, poden donar-se casos que puguin permear la membrana, per exemple en el cas de compostos de mida molt petita com pot ser l'amoni ( $\text{NH}_3^+$ ), que a més de tenir una dimensió reduïda és altament soluble en l'aigua.

Tot i que això introdueix un cert error en el model, considerem que no té perquè invalidar-lo ni tampoc les conclusions que se n'extreuen. En aquest sentit comentar que, d'una banda, al canal de l'electròlit aquest és estèril i no hi haurà pas de biomassa bacteriana a través de la membrana, per la qual cosa podem descartar que s'hi donin processos de descomposició (tot i que pot haver-hi processos d'oxidació química, però aquests també seran comptabilitzats com a consum d'oxigen a l'anàlisi). D'una altra banda, considerem que aquests compostos no són especialment rellevants en els processos de passivació de l'elèctrode, com podrien ser-ho molècules orgàniques de major entitat/mida.

### Composició del medi

a) Salinitat: en aquest cas s'ha optat per utilitzar un valor típic d'aigües dolces. No s'ha considerat per al model ni l'increment de la salinitat que es pugui deure a l'espècie utilitzada com a electròlit ni a mostres amb alta càrrega orgànica.

En qualsevol cas, cal esmentar que al model l'efecte de la salinitat només es comptabilitza com a factor modificador de la densitat del fluid aquós i, per tant, té una baixa incidència en els resultats.

b) Saturació d'oxigen a l'aigua (sat): aquest és un valor que, per a les condicions del model operat a una temperatura estàndard de laboratori de 293,2 K, té un valor de 0,5631 mM. En el model, però, no està directament introduït com un valor fix, sinó com una equació que determina el valor de saturació de l'oxigen en aigua en funció de la temperatura i la salinitat; per tant, es poden simular altres situacions a temperatures superiors o inferiors només canviant aquest valor i el model s'hi adaptarà automàticament, amb nous valors de saturació .

c) Concentració de DBO: en tot el treball utilitzem els valors de 30, 300 i 3.000 mg/l de  $\text{DBO}_5$ . Tot i que aquests valors són en si arbitraris responen a diferents valors estàndards d'ús comú. Així, 30 mg/l de  $\text{DBO}_5$  és en molts casos el límit superior per abocament a llera pública a la sortida d'una EDAR; 300 és un valor estàndard per a una aigua residual d'origen humà, i 3.000, el d'un abocament industrial típic (tot i que aquest darrer és molt variable en funció de la indústria a què ens referim).

### 3.4.3. REACCIÓ BIOLÒGICA

Respecte a la reacció biològica alguns aspectes ja s'han comentat. Potser cal, però, ressaltar un parell de consideracions:

a) Concentració de biomassa: un dels factors clau per reduir el temps d'anàlisi de la DBO és assolir una concentració màxima de bacteris per tal d'incrementar la respiració per unitat de temps i fer l'anàlisi equivalent a processos de major durada ja que molts dels sistemes de determinació ràpida de la DBO es basen en aquest fet, mitjançant biofilms o més concretament compactats bacterians a la proximitat de l'elèctrode.

En el nostre cas volíem evitar la manipulació que aquesta tècnica implica. Hem optat per treballar amb concentrats bacterians, i els valors utilitzats són extrets d'experiments

previs fets en el mateix grup de recerca i publicats a (Godino et al. 2008). En aquests experiments s'assolien i es treballava amb concentracions de fins a més de  $10^{11}$  CFU/ml.

La concentració que s'obté d'un cultiu ric es troba entre  $10^8$  i  $10^9$  CFU/ml i és la que utilitzem inicialment en les simulacions ( $10^{15}$  CFU/m<sup>3</sup>).

- b) Ritme màxim de respiració bacteriana: respon a experiments descrits a (Godino et al. 2008) per a les mateixes concentracions bacterianes.

#### 3.4.4. MODEL ELECTROQUÍMIC

En aquest apartat hi ha poc a comentar, R és l'oxigen reduït a l'elèctrode, que tot i la quasi instantània transformació a efectes del modelat es considera que manté els valors coneguts de l'oxigen en el sistema.

Els valors per definir el model de reacció a la superfície de l'elèctrode són derivats d'aplicar les constants de l'oxigen al desenvolupament electroquímic descrit a l'apartat 3.3.2.

### 3.5. COMENTARIS DELS RESOLEDORS

En aquest apartat comentarem més específicament alguns aspectes rellevants del model construït mitjançant COMSOL. Molts dels aspectes són condicionants de cara a la possibilitat de trobar una solució al model o determinants en els requeriments de càlcul per a la solució del problema.

El mètode de FEM es basa en la construcció d'una matriu de tensors (Stiffness Matrix, (Zimmerman 2006)). Originalment COMSOL era una "caixa d'eines" per a la resolució d'equacions diferencials en MATLAB, que es basa en el càlcul matricial (literalment el nom prové de Matrix Laboratory).

Per la naturalesa del problema plantejat, on els elements (variables) s'interrelacionen entre ells, sempre ens trobarem amb el cas de models no lineals (Dickinson et al. 2014; McLaughlin n.d.), fet que implicarà que la matriu de càlcul no es podrà simplificar (via diagonalització), per tant, sempre requerirà més capacitat de càlcul que un model lineal (Zimmerman 2006):

A continuació s'expliquen els aspectes més rellevants del model.

#### 3.5.1. ESTABLIMENT DE LES CONDICIONS INICIALS

Un aspecte clau i recurrent per resoldre un problema amb el mètode FEM és tenir unes condicions inicials ben definides i unes magnituds de canvi suficientment petites. Si bé el mateix paquet informàtic ja té mecanismes automatitzats per adaptar-se a les diferents condicions del problema (mitjançant l'establiment d'un error estimat màxim o bé gestionant el valor dels passos temporals en funció de l'error estimat), el mateix problema pot obtenir o no una solució en funció de com es plantegi i es determini el programa.

En general, una font d'error la trobem associada a taxes de canvi massa grans, que poden donar lloc a singularitats.

Al model proposat tenim diversos paràmetres que treballen amb magnituds molt diferents, fet que ha requerit un treball previ per tal de determinar unes condicions inicials que permetessin arrencar i resoldre les simulacions. Les principals són:

##### a) Problemes per canvis de magnitud

**Longitud:** es combinen aspectes com la convecció o la hidrodinàmica microfluídica, que són rellevants en magnituds de mil·límetres o micres, amb altres aspectes com l'electroquímica de l'elèctrode, que són rellevants a escales submicromètriques o nanomètriques.

**Velocitat:** al model tenim reaccions a diferents velocitats, com per exemple la difusió de l'oxigen a través de la membrana (en funció de gradients de concentració), relativament lenta, combinada amb reaccions molt més ràpides, com les que es donen a la superfície de l'elèctrode.

**Geometria:** sovint aspectes geomètrics a priori trivials poden ser una font de dificultats ja que impliquen canvis ràpids que poden donar lloc a singularitats matemàtiques, per exemple amb angles rectes o similars. Així, per exemple, s'ha optat per simplificar al màxim la geometria del problema per tal d'evitar aquest tipus d'inconvenients.

On no s'ha pogut evitar, però, és als punts d'unió entre el canal i la superfície de l'elèctrode, que passa de zero a la totalitat de la reacció electroquímica en una distància virtualment

igual a zero. Això s'ha resolt mitjançant una adaptació del mallat a aquesta zona en concret (vegeu el punt 3.5.2).

#### b) Models estacionaris i continus

Un altre aspecte rellevant pel que fa al requeriment de càlcul i a l'obtenció d'unes condicions inicials correctes és la combinació de models estacionaris (molt més simples de resoldre) i continus.

Si bé el problema plantejat és essencialment dependent del paràmetre temps ( $t$ ) que requereix l'ús de resoladors continus, s'han exclòs les parts que es podien calcular de forma estacionària per tal de facilitar el funcionament del model i reduir els requeriments de càlcul.

Atès que en circuits microfluídics el flux obtingut és laminar, sense presència de fluxos turbulents, i després de resoldre el flux laminar en models continus i comprovar l'absència de turbulència (mitjançant el valor del nombre de Reynolds), s'ha optat per resoldre la fluídica de forma estacionària, i aplicar la resta del model dependent del temps a aquesta solució prèviament obtinguda. Així, en lloc de introduir les variables de descripció de la fluídica com a caselles de la matriu de tensors a calcular, s'utilitzen els valors resultants (per exemple, velocitat o moment en cada punt del model) com a constants, simplificant l'obtenció d'una solució i reduint el requeriment total de càlcul.

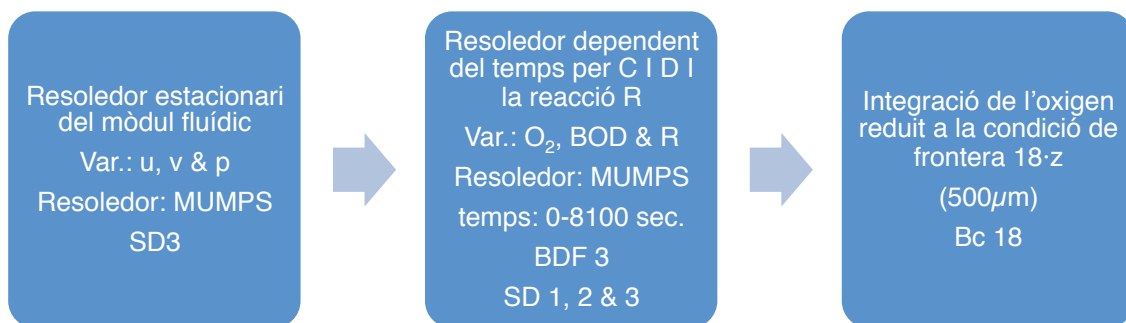


Figura 3.8: Esquema simplificat dels passos per a la solució de les simulacions plantejades

### 3.5.2. MALLAT I PRECISIÓ

Com s'ha comentat al punt 3.2, el mètode dels elements finits es basa críticament en la descomposició de l'espai del problema en elements menors. Això s'assoleix mitjançant una tècnica denominada mallat, que permet l'aproximació pel càlcul a la solució.

Aquest mallat determinarà els nodes en els quals es realitza en si el càlcul del valor de les variables i els paràmetres que descriuen el model (Godino Amado et al. 2010). Idealment un mallat infinitament petit donarà la millor aproximació a la solució real del problema, però requerirà una quantitat exponencialment major de càlcul per resoldre'l. Per tant, caldrà establir uns criteris d'optimització del mallat per assolir el millor compromís possible entre l'exactitud de la solució obtinguda i el requeriment de càlcul per obtenir-la (Dickinson et al. 2014; McLaughlin n.d.; Zimmerman 2006).

Atès que els processos en estudi no es donen igual a la totalitat de la geometria del model i que hi trobem zones amb marcades diferències en la magnitud dels gradients, el mallat inicial s'ha

refinat per tal d'adaptar-lo a les característiques del problema en estudi de forma teòrica. Així, per exemple, s'ha forçat que algunes zones tinguin una malla de major precisió, com són:

- a) Interior i proximitat de la membrana de separació, on es donen els màxims gradients de concentració per difusió.
- b) Proximitat a la superfície de l'elèctrode, on es donen grans gradients de concentració i diferències en les velocitats de reacció.

Un cop establerta aquesta malla inicial, que s'ha aproximat comparant les solucions obtingudes amb malles de diferents dimensions i l'error estimat pel mateix programari de COMSOL per a cadascun dels nodes, s'ha utilitzat l'eina de mallat adaptatiu de COMSOL 4.3. Aquesta eina matemàtica refina automàticament la malla en les zones on estima un major error en la solució del problema (Dickinson et al. 2014; Zimmerman 2006).

En el nostre cas, s'han utilitzat 3 iteracions sobre la malla inicial plantejada, apart d'algunes constriccions que es comenten a la figura 3.8.

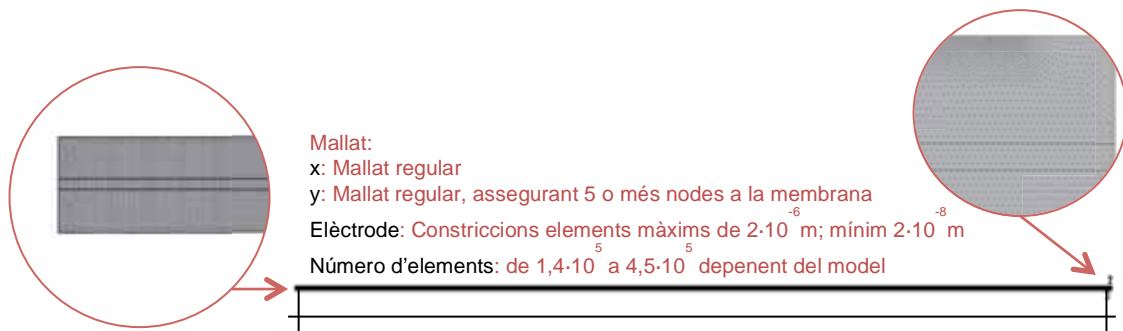


Figura 3.9: Detall del mallat del model. A la part inferior s'observa el model mallat a escala (aproximadament x3). Les ampliacions corresponen a (1) Mallat a la entrada del dispositiu i (2) mallat a la proximitat de l'elèctrode.

### 3.5.3. REQUERIMENTS DE CàLCUL

Si partim de l'equació (3.1) presentada al punt 3.2:

$$u = \sum_i u_i \varphi_i$$

Veurem que de forma esquemàtica, el requeriment de càlcul d'un model que es resolgui pel mètode FEM serà aproximadament el producte següent:

$$\text{Requeriment de càlcul} = [\text{variables i paràmetres}] * [\text{funcions}] * [\text{nodes}]$$

Això esquemàticament exemplifica els comentaris dels punts anteriors referits a l'elecció d'una malla suficientment acurada, a l'ús de les solucions de models estacionaris (com és el cas de la fluídica, que permet introduir un valor de moment fix per a cada node, i per tant, redueix les funcions al model, substituint-les per constants per a cadascun dels nodes) o a evitar l'ús de models 3D, sempre que puguin ser simplificats adequadament en models de dimensió inferior.

Un altre factor determinant per al requeriment de càlcul és si el model a resoldre és o no lineal. En el cas de models lineals, la matriu de tensors utilitzada per resoldre el sistema de derivades parcials per FEM és diagonalitzable, és a dir que la matriu és simètrica diagonalment i per tant calculant només la meitat de la matriu s'obtenen tots els resultats (Zimmerman 2006).



En els casos en què la matriu de tensors no és diagonalitzable, parlem de problemes no lineals. Aquests, en si mateixos requereixen una major capacitat de càlcul per a les mateixes variables i nodes. Tant els sistemes electroquímics com els fluídics es caracteritzen per ser problemes altament no lineals, fet que a més a més de l'increment de càlcul ja esmentat implicarà un seguit de problemes a nivell computacional, com és l'aparició de singularitats i la major dificultat per trobar una solució per a cadascun dels nodes del sistema (Dickinson et al. 2014).

Ateses aquestes característiques, a les simulacions s'ha aplicat un mètode d'estabilització anomenat BDF (o *Backwards Differentiation Formula*). Essencialment, el sistema d'aproximació a la solució per al node i per a qualsevol variable, és mitjançant el mètode de Newton (Atkins 2002). Per a sistemes no altament no-lineals, s'escull el resultat d'una iteració calculada per aproximar el resultat en el següent pas de temps. Amb tot, aquest procediment és molt sensible a condicions no-lineals, que fa que s'obtinguin resultats no vàlids (com, per exemple, concentracions negatives d'una espècie) o que s'arribi a singularitats (en molts casos concentracions o velocitats de canvi que tendeixen a l'infinit).

Per tal d'estabilitzar el sistema d'equacions, als models descrits s'ha optat per aplicar el mètode BDF amb un nombre d'iteracions de 3. Aquest mètode, permet establir una tolerància determinada a cadascun dels càlculs d'un node, a partir de la qual, el programa escull automàticament un pas de temps apropiat (Dickinson et al. 2014).

El mètode BDF de 3 iteracions implica que el node ha de mantenir la mateixa tendència en tres càlculs consecutius per a cada node i variable, de forma que les solucions convergeixin cap a un mateix valor, reduint l'error. En cas contrari, el programari repeteix el càlcul amb passos de temps menors fins a acomplir aquesta constricció i seguir el procés.

Això implica un increment notori en els requeriments de càlcul, addicional als esmentats anteriorment, però que dona una gran estabilitat a les solucions obtingudes i millora dràsticament els resultats obtinguts.

En els casos resolts, s'han observat passos temporals de l'ordre de les deumilionèsimes de segon, en certs càlculs, fet que esquemàticament implicaria resoldre el conjunt de les equacions de la matriu de tensors uns deu milions de cops per resoldre un model dinàmic d'un segon. El mètode BDF, però, incrementa els passos de càlcul a mesura que les solucions obtingudes són congruents entre elles (sí més no amb els tres passos de càlcul anteriors, per aquell node), de manera que quan l'error no arriba a un valor estimat determinat, el simulador s'accelerarà fins al pas de temps màxim establert al resoledor.

En resum, els principals limitants a la resolució d'un sistema d'equacions pel que fa a la computació es poden separar en tres grans blocs:

- a) Memòria RAM, que és la que ha de permetre com a mínim el càlcul d'un cicle temporal de la matriu de tensors. Aquesta memòria es pot suplir parcialment amb sistemes operatius que tinguin una bona gestió de la memòria flotant, però implicarà un major temps per l'obtenció dels resultats i una major probabilitat d'errors.
- b) Velocitat de computació suficient per resoldre les simulacions amb temps raonables (a tall d'exemple algunes de les solucions presentades han tardat entre 4 i 6 dies de càlcul per simulació, tot i disposar d'estacions de treball de 32 Gb de RAM).
- c) Espai d'emmagatzematge suficient, ens referim a l'emmagatzematge extern, per exemple, en un disc dur. Aquí cal separar l'espai d'emmagatzematge en format

RAM del dels resultats de les simulacions. Al primer cas, es quadren tots els valors de totes les variables per a cadascun dels nodes per ser utilitzats en el següent pas temporal i seguidament s'esborren per encabir-hi els resultats següents. Per contra, al disc dur s'hi guarden tots els resultats de totes les variables per a cadascun dels nodes per a una sèrie de valors de temps ( $t$ ) predeterminat, que seran les que es podran recuperar per ser analitzades un cop la simulació s'hagi resolt completament.

Com es pot concloure d'aquestes consideracions, factors com un correcte mallat seran determinants per poder obtenir uns resultats vàlids amb una inversió de computació i un temps raonables.

En el mateix sentit, es pot concloure també que simular models en 3D només estarà justificat en casos en què es doni una alta heterogeneïtat en el model en l'eix ( $z$ ), mentre que per a models que es puguin simplificar satisfactòriament en models 2D, com és el nostre cas, serà molt més òptim emprar la capacitat de càlcul disponible per refinar les àrees que presentin una major inestabilitat, gradient o tendència a donar singularitats matemàtiques.

### 3.6. ANÀLISIS PARAMÈTRIQVES

Una altra eina que hem emprat profusament en el present treball és l'ús de les anomenades *anàlisis paramètriques*. COMSOL permet introduir com a paramètric qualsevol dels paràmetres utilitzats en el model.

S'ha utilitzat per poder comparar amb major facilitat els resultats sota diferents condicions, ja que els diferents resultats queden en el mateix document i s'hi poden aplicar totes les eines d'anàlisis de la solució incloses a COMSOL sense haver de traspasar-ho a altres programes.

S'han resolt com a paramètriques les simulacions:

- a) Diferents alçades (gruixos) de la membrana.
- b) Diferents velocitats de circulació de l'electròlit pels canals.
- c) Diferents concentracions de DBO.
- d) Diferents alçades del canal de l'electròlit i de la cambra de reacció.

### 3.7. RESULTATS DE LES SIMULACIONS

Modelar el sistema abans de la fabricació ens ha permès anar redefinint i refinant el dispositiu inicialment concebut, i és per això que, tot i estalviar-vos passos que han donat resultats negatius o aproximacions que no han prosperat, mantindrem l'esquelet del procés per exemplificar-lo i fer més entenedor el desenvolupament dut a terme.

Una conseqüència d'això és que no totes les simulacions s'han resolt amb el mateix model, sinó que l'hem anat adaptant i refinant correlativament amb els altres aspectes del treball. És per això que a l'inici de cada apartat farem una breu descripció de les condicions amb què s'han resolt els models als quals es fa referència.

Aquesta part de simulació numèrica, l'hem dividida en tres grans blocs, segons els principals aspectes en estudi en cadascun d'ells. El primer tracta l'estudi de la dinàmica de difusió de l'oxigen en el sistema, en un model "infinitament" llarg, per tal de conèixer la dinàmica i aproximar la longitud òptima del sistema, a la vegada que ens permet descartar que hi hagi efectes de frontera.

Aquest transport difusiu de l'oxigen es compara també amb diferents materials utilitzables per fabricar la membrana de separació entre el canal de transport de l'electròlit i la cambra de reacció de la matèria orgànica.

Al segon apartat, ens centrem a analitzar el funcionament del dispositiu en funció de la càrrega orgànica de la mostra i de la velocitat de flux de l'electròlit. La càrrega tindrà una relació directa amb la quantitat d'oxigen requerit per reduir-la al sistema, mentre que la velocitat de flux determinarà la quantitat d'oxigen introduït al sistema. Aquí doncs, analitzarem la viabilitat del sistema davant de diferents situacions plausibles.

Finalment, analitzarem la concentració d'oxigen al punt de mesura, és a dir, a la superfície de l'elèctrode de treball del sensor. En aquest apartat podrem estimar aspectes com la intensitat del senyal elèctric obtingut, la forma en el temps d'aquest senyal i les conseqüències derivades del fet que per obtenir el senyal es consumeixi part de l'oxigen present al sistema.

En tot el capítol, utilitzarem la nomenclatura descrita a la figura 3.7, que per tal de facilitar la lectura tornem a reproduir.

A part de les principals àrees del model, que ja s'han comentat, que corresponen als subdominis, condicions de frontera i elements principals, cal definir els punts que s'han considerat rellevants i que en endavant s'utilitzaran per analitzar comparativament els resultats de les simulacions.

Les simulacions donen resultats per a tots i cadascun dels nodes del mallat del model i per a cada temps de càlcul. Això genera una quantitat ingent de dades, per la qual cosa s'han definit un seguit de punts que es consideren rellevants per facilitar l'anàlisi de dades i fer que aquestes vinguin dels mateixos punts en els diferents models analitzats, per facilitar-ne la comparació.

D'aquests punts rellevants, alguns ja eren al model (com els vèrtexs dels diferents subdominis) i d'altres s'han introduït com a punts adimensionals inclosos en la geometria del model, fent que es guardessin els resultats per a totes les variables en els intervals de temps definits al resolador, i d'aquí s'obtenen les dades que es presentaran a continuació, que descriurem breument i de les quals justificarem l'elecció:

Punts [4,10,13,16,21,  $X_0$ ,  $X_e$ ]: Part superior del canal de l'electròlit:

Tot i disposar de valors de la concentració d'oxigen per a tota la superfície del model, s'han definit diferents punts a la part superior del canal, ja que seran els més rellevants i comparables amb la concentració d'oxigen que trobarem a la superfície de l'elèctrode. Aquests punts s'han distribuït per tota la longitud a fi de poder analitzar com varia la concentració d'oxigen en l'eix x. Els punts  $X_0$  i  $X_e$  defineixen el segment de l'elèctrode.

Punts [1,5,6,7,8,11,14,17,18]: Part inferior de la cambra de reacció:

Són els punts més limitants pel que fa a l'arribada d'oxigen, ja que la cambra de reacció inicia la simulació en condicions anòxiques i, per tant, l'oxigen hi arribarà per difusió, sempre que ho permeti el consum derivat de la descomposició biològica (no en tots els casos s'ha inclòs el consum biològic, vegeu-ho més avall).

Punts [9,12,15]: Zona intermèdia de la cambra de reacció:

Es consideren punts representatius de la situació general de la cambra de reacció, sense la disponibilitat d'oxigen de les zones superiors, ni la limitació de les inferiors.

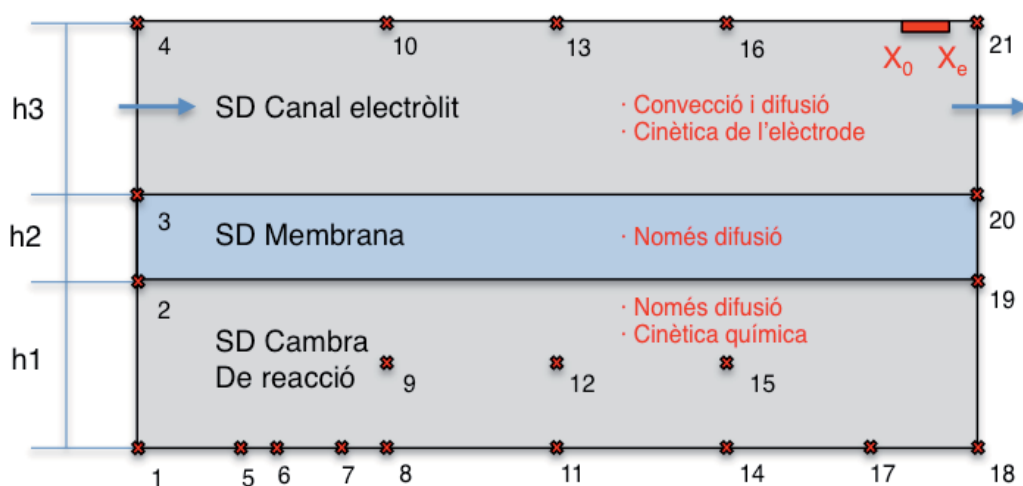


Figura 3.7: Descripció esquemàtica del model i punts rellevants a partir dels quals s'han analitzat els resultats.

En endavant, tots els punts senyalats a les gràfiques o al text se cenyiran a aquesta nomenclatura.

### 3.7.1. TRANSPORT D'OXIGEN I MEMBRANES DE SEPARACIÓ

A la primera fase del modelat, ens centrem en un model el més simplificat possible, per tal de facilitar la validació dels resultats que es van obtenint. Així, s'ometen les parts de reacció biològica i consum d'oxigen, d'una banda (simulem una situació de no presència de matèria orgànica ni bacteris), i la part electroquímica del sensor, de l'altra.

Les preguntes clau que intentem resoldre seran, doncs, dos conceptes basals:

- Com afecta la difusibilitat i gruix del material emprat com a membrana de separació entre el canal de l'elèctrolit i la cambra de reacció al transport d'oxigen
- Com difon l'oxigen al llarg del dispositiu, i si hi ha limitacions o canvis en funció de la longitud

El model que es construeix té una longitud ( $L$ ) de 13 cm; encara que originalment és la longitud del primer prototip dissenyat, posteriorment es mostrarà com una longitud excessiva. És per això que podem considerar-lo un model de longitud "infinita", a partir dels resultats del qual s'ha establert el rang de longituds viables per al dispositiu, de 5 cm, que s'utilitzarà en els models ulteriors.

A continuació es detallen les característiques dels models utilitzats per dur a terme aquestes simulacions:

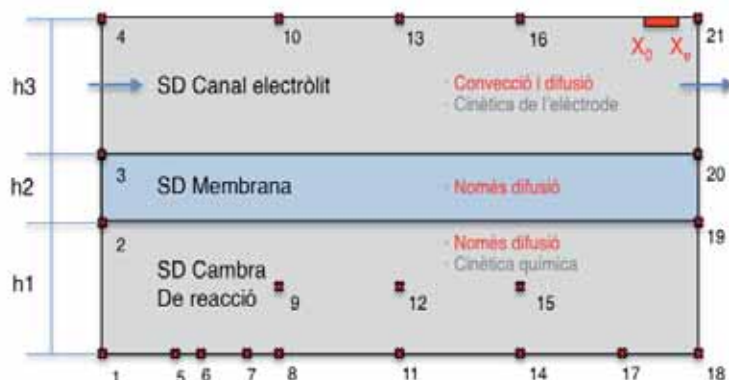


Figura 3.10: Mòduls actius a les simulacions del transport d'oxigen i materials de membrana (en vermell), els inactius apareixen en gris.

Paràmetre	Descripció	Valor	Unitats
h1	Alçada de la cambra de reacció	50	$\mu\text{m}$
h2	Gruix de la membrana	25-75-200	$\mu\text{m}$
h3	Alçada del canal de l'electròlit	50	$\mu\text{m}$
$L$	Longitud total	0,13	m
$V_{in}$	Velocitat mitjana del flux	40	$10^{-4}$ m/s
$C_{0\_O_2\_chan}$	Concentració inicial $O_2$ canal de l'electròlit	0,5631	mols/l
$C_{0\_O_2\_rc}$	Concentració inicial $O_2$ cambra de reacció	0	mols/l
$t$	Temps simulat	8100	s
$C_{0\_BOD}$	Concentració inicial de la DBO	No aplica	
	Model electroquímic	No aplica	
	Nodes del mallat del model	$1,4 \cdot 10^5$	Unitats (1)

(1) Varia lleugerament en funció del gruix de les membranes analitzades

Taula 3.2. Condicions de les simulacions per a l'anàlisi de materials de membrana i difusió de l'oxigen sense consum bacterià.

## MATERIALS I GRUIXOS DE MEMBRANES

Un element clau del disseny que es proposa i s'analiza és la separació física de dues zones diferenciades: la cambra de reacció, on s'introdueix la mostra i la biomassa bacteriana, i el canal de l'electròlit, on es fa circular un cabal conegut a concentració de saturació d'oxigen dissolt. Aquesta és una diferència clau del sistema proposat respecte a les anàlisis electroquímiques estàndards. Si bé en tots els casos la superfície de l'elèctrode es protegeix de la mostra i biomassa per tal de limitar els processos de passivació que malmeten la seva superfície i alteren els resultats obtinguts, mitjançant un component principalment permeable a l'oxigen, però no a altres compostos, en el sistema proposat s'ha optat per una configuració nova. Així, aquesta separació no es fa en la proximitat immediata de l'elèctrode, sinó en tota la

longitud del dispositiu, mitjançant la separació dels dos canals o cambres mitjançant l'esmentada membrana.

Aquesta disposició ha de permetre igualment, la no entrada en contacte amb la superfície de l'elèctrode de material orgànic o altres compostos (com la calç o el ferro) que s'hi pugui adherir o acumular i disminuir l'àrea de treball efectiu, és a dir, el que es coneix com a passivació de l'elèctrode. Però amb el present disseny d'una banda s'incrementa exponencialment l'àrea de superfície permeable a l'oxigen de la membrana de separació a l'espècie objectiu (l'oxigen), i de l'altra no s'interfereixen les dinàmiques de transport a la proximitat de l'elèctrode. Per la seva rellevància, aquest serà un aspecte que es tractarà més detalladament a les conclusions finals.

Els materials escollits per comparar han estat dos polímers comuns, com són el PDMS (polidimetilsiloxà) i el PTFE (politetrafluoretilè), que descrivim breument:

PDMS: és un polímer del grup de les organosilicones, àmpliament utilitzat per les seves característiques: és un material flexible (reològic), no tòxic i essencialment inert. Un altre dels factors que fa que sigui molt utilitzat és la seva estabilitat a un ampli marc ambiental de temperatures (-80 °C a +250) i la baixa absorció de l'aigua, atesa l'alta hidrofobicitat que presenta. També és conegut per ser un material permeable als gasos, propietat que el fa un bon difusor de l'oxigen, permetent-ne l'ús, per exemple, en lents de contacte. De fet, el PDMS (com també el PTFE) és un material hidrofòbic, per la qual cosa cal considerar que el transport d'oxigen entre les dues cares de la membrana es realitzarà en estat gasos, per difusió a favor de gradient, fet que ha de prevenir el pas d'altres compostos que requereixin un medi aquós per al seu transport.

PTFE: sovint conegut pel nom comercial de Teflon (DuPont). És un polímer del grup dels fluorocarbonis. Mostra fins i tot una major estabilitat davant de condicions ambientals i químiques que la silicona i té una gran estabilitat estructural. Àmpliament utilitzat per ser el material conegut que mostra un menor coeficient de fricció, que pot prevenir l'adhesió de la biomassa o altres compostos a la seva superfície. El PTFE presenta, però, un menor nivell de difusibilitat de l'oxigen que el PDMS.

L'element clau per al model d'ambdós materials de membrana és la difusibilitat que presenten a l'oxigen en condicions submergides en líquid aquós

Per a ambdós materials s'han analitzat gruixos que estan disponibles comercialment i que mesuren 200, 75 i 25 micres.

La difusibilitat de l'oxigen en aquests materials a 25 °C s'ha extret de cites bibliogràfiques, com es comenta al punt 3.4.

Els resultats es comentaran juntament amb els del següent punt de difusibilitat de l'oxigen.

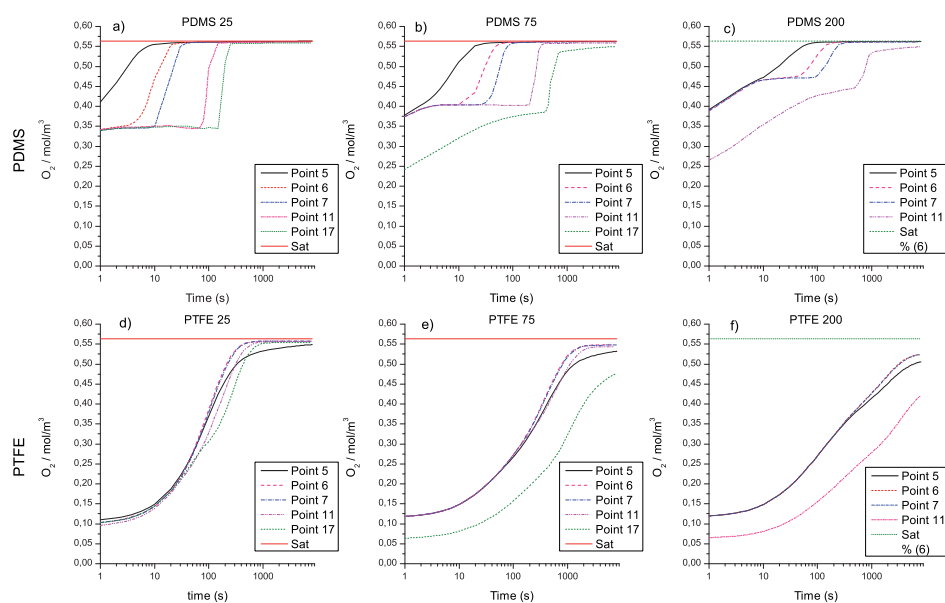
#### DINÀMICA DE L'OXIGEN: CAS SENSE REACCIÓ

Un dels requeriments clau del dispositiu dissenyat és que la disponibilitat d'oxigen no limiti la respiració aeròbica de la biomassa present a la cambra de reacció. En el present sistema això tindrà una especial relació amb el fet que la membrana de separació de la cambra de reacció al canal de l'electròlit tingui un transport prou ràpid de l'oxigen per prevenir que es donin condicions anaeròbiques a la cambra de reacció.

A més a més, atès que tant les poblacions bacterianes en medi natural com algunes de les espècies considerades per fer un cultiu ric per dur a terme la mostra, com és el cas d'*E. coli*, són facultatives en l'ús de metabolismes aeròbics i anaeròbics, caldrà que la concentració

d'oxigen no es trobi per sota de 0,05 mM, durant períodes rellevants de temps, ja que en aquestes condicions s'activen les vies metabòliques del metabolisme anaeròbic i això alteraria els resultats de l'experiment (o la mesura) perquè descompondrien matèria orgànica sense consum d'oxigen.

De cara a analitzar els gràfics en els quals presentem els resultats, cal fer algunes puntualitzacions rellevants:



**Gràfic 3.1. Resultats de les simulacions per a diferents gruixos de les membranes.**

L'eix x dels gràfics, que correspon a la variable temps, és en tots els casos en escala logarítmica, atès que en els períodes de temps curts es donen els canvis més rellevants per als casos que ens interessin (on el transport d'oxigen és més ràpid).

A tots els gràfics s'inclou una línia vermella que indica el nivell de saturació d'oxigen per a l'aigua amb la temperatura de treball seleccionada, 0,563 mM en el nostre cas per a 25 °C, i la concentració de sals estimada. Per tant, que a un punt de la simulació s'arribi a aquest nivell significa que no adquirirà més oxigen tot i que se n'hi subministri; contràriament, els punts que a un temps determinat no hagin assolit el nivell de saturació, no hauran rebut l'oxigen màxim que poden mantenir. Cal recordar que en aquestes simulacions no es considera cap consum d'oxigen i només n'observem el transport.

Els punts escollits per representar gràficament són els que s'han considerat més limitants pel que fa al transport d'oxigen i, per tant, tots ells se situen a la base o part inferior de la cambra de reacció, ja que la cambra no disposa de sistema d'agitació i, per tant, el transport es veurà limitat al transport per difusió essencialment vertical (en l'eix y).

Als gràfics s'observa un primer nivell d'equilibri de l'oxigen que varia en funció del material i el gruix de la membrana de separació. Això és degut al fet que a temps zero de les simulacions, les concentracions inicials d'oxigen són de zero per a la cambra de reacció i de saturació tant per al canal de l'electròlit com per a la membrana. Així, aquest primer equilibri inicial és degut a canvis molt ràpids en les primeres fraccions de segon de les simulacions (ja que hi ha un alt



gradient de concentració entre punts molt pròxims), fet que dona un pseudoequilibri que es correlaciona bé amb la suma del volum de canal de l'electròlit més la membrana, d'una banda, i el volum de la cambra de reacció, de l'altra. Per tant, com més gruixuda és la membrana més oxigen hi ha inicialment al sistema i el primer equilibri d'oxigen assolit és més gran.

Sabem que això representa una certa idealització, i és també un dels aspectes de la dificultat de trobar les condicions inicials del sistema, com es comenta al punt 3.5.1 d'establiment de les condicions inicials de les simulacions.

Als gràfics de les diferents simulacions, observem molt clarament un patró molt diferent entre les que corresponen a membranes de PDMS i PTFE. A les primeres, veiem que els punts es mantenen aproximadament al nivell d'equilibri inicial i posteriorment puja més o menys ràpidament la concentració d'oxigen de forma correlativa. Així, els punts més proximals a l'entrada de l'electròlit assoleixen la saturació en entre uns 20, 40 i 150 segons, depenent del gruix de la membrana, i els més distals requereixen més temps com més allunyats es troben. Entenem que aquesta dinàmica es deu a la major permeabilitat de l'oxigen al material de base de silicona, que limita menys la difusió vertical de l'oxigen i, per tant, es redueix significativament el transport d'oxigen pel canal de l'electròlit fins que els punts més proximals no es troben pròxims a la saturació.

Per contra, en els casos de les membranes de PTFE, de menor permeabilitat a l'oxigen, el contingut en oxigen no baixa tan dramàticament en la zona proximal i es manté més igualat al llarg del canal de l'electròlit, fent que el patró de difusió a la cambra de reacció sigui més homogeni i s'iguali l'increment en els diferents punts representats al gràfic. Podem dir, doncs, que en les simulacions amb PDMA el patró d'increment d'oxigen respon a un esquema longitudinal, mentre que en els casos de les membranes de PTFE aquest esquema és essencialment de component vertical, perquè en aquest darrer material la difusió és molt més lenta a través de la membrana, que esdevé l'element clarament limitant.

En un altre ordre de coses, cal observar que per a les membranes de PDMS s'assoleix la concentració d'oxigen per a gairebé tots els punts analitzats (amb excepció del punt 17 al cas gràfic 3.1 b i dels punts 11 i 17 en el cas 3.1 c). Com era esperable, el millor comportament el trobem en la membrana més permeable a l'oxigen i de menor gruix, descrita al cas Gràfic 3.1 a.

En aquest cas assolim la concentració de saturació en un període pròxim als 200 segons per al punt 17, emplaçat al punt més distal del sistema.

En el cas de les membranes de PTFE, ens trobem que fins i tot en el cas de la membrana de 25 micres (Gràfic 3.1 d), no s'arriba assolir el nivell de saturació per a cap dels punts en els 8.000 segons simulats, i només obtenim nivells significatius de concentració d'oxigen al cap d'uns 600 segons.

Per a les membranes de major gruix, s'extrema el mateix patró observat en el cas anterior i, per exemple, a la membrana de 200 micres de gruix, al final de les simulacions cap punt ha assolit una concentració superior a 0,52 mM i, per tant, no s'ha arribat al nivell de saturació de l'oxigen en l'aigua.

En conclusió, perquè el dispositiu que es vol desenvolupar sigui viable, caldrà utilitzar una membrana el més prima i permeable a l'oxigen possible, com la de PDMS de 25 micres, i també serà recomanable limitar la longitud del canal per tal de poder aportar l'oxigen necessari per fer la degradació aeròbica de la matèria orgànica.

En aquest sentit, les simulacions que inclouen la degradació de la matèria orgànica, que es presenten en el punt següent, ja preveuen un canal de menor longitud (50 mm en lloc de 130 mm) per limitar els efectes del transport descrits al gràfic 3.1 a.

### 3.7.2. CINÈTICA DE LA RESPIRACIÓ

#### CONDICIONS DEL MODEL

A partir dels resultats obtinguts en les primeres simulacions sense reacció biològica, s'ha optat per modificar algun dels paràmetres del model, passant la longitud total del dispositiu de 130 mm a 50 mm, ja que la longitud del dispositiu no afecta la retenció a la cambra de reacció i en canvi comporta limitacions rellevants de cara a garantir un bon subministrament d'oxigen al conjunt del dispositiu.

Així mateix, s'ha optat per la configuració de membrana que permet un major transport d'oxigen, que correspon a la membrana de PDMS de 25 micres de gruix. Aquests canvis es descriuen a la taula anterior.

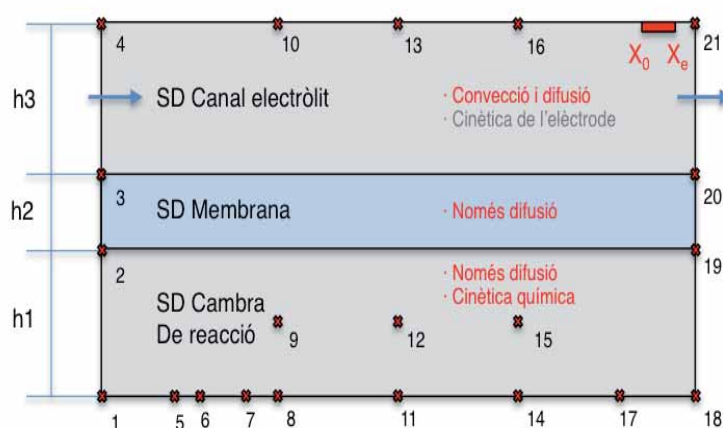


Figura 3.11: Mòduls actius a les simulacions de la cinètica de la respiració (en vermell).

Paràmetre	Descripció	Valor	Unitats
h1	Alçada de la cambra de reacció	50	$\mu\text{m}$
h2	Gruix de la membrana	25	$\mu\text{m}$
h3	Alçada del canal de l'electròlit	50	$\mu\text{m}$
L	Longitud total	0,05	m
$V_{in}$	Velocitat mitjana del flux	4,8,12,16	$10^{-4}$ m/s
$C_{0\_O_2\_chan}$	Concentració inicial $O_2$ canal de l'electròlit	0,5631	mols/l
$C_{0\_O_2\_rc}$	Concentració inicial $O_2$ cambra de reacció	0	mols/l
t	Temps simulat	8.100	s
$C_0\_BOD$	Concentració inicial de la DBO	30,300,3.000	
	Model electroquímic	No aplica	
	Nodes del mallat del model	$1,4 \cdot 10^5$	Unitats (1)

Taula 3.3. Condicions del simulador per a les simulacions que es presenten.

Pel que fa als gràfics de resultats que comentarem, cal dir que en aquest cas s'ha optat per no utilitzar una escala logarítmica a l'eix x per al paràmetre t (temps), ja que, d'una banda, els canvis inicials no són tant ràpids, i de l'altra, ens ofereix una interpretació més fàcil.

A diferència dels models comentats en l'apartat anterior, aquí ja considerem els paràmetres que descriuen tant la presència de la biomassa encarregada de la descomposició de la matèria

orgànica com de diferents concentracions d'aquesta matèria i els consum d'oxigen que això comporta amb un metabolisme aeròbic, com es descriu en l'apartat corresponent (3.4.3).

No introduïm, però, encara el bloc electroquímic del model, ja que no afectarà els aspectes que volem analitzar i implica una major complexitat per a la resolució de la simulació.

Bases de la respiració:

Com s'ha comentat sense entrar en profunditat a la descripció del model, la respiració duta a terme per la biomassa bacteriana tindrà dos components principals, que són la respiració basal pel manteniment metabòlic i la respiració causada per la degradació aeròbica de la biomassa present com a DBO. Respecte a la respiració basal, pot ser rellevant en certes situacions i serà en qualsevol cas una bona prova blanc de cara a la validació del dispositiu i el refinament dels resultats (vegeu apartats 6 i 7.2).

Respecte al consum d'oxigen derivat de la descomposició aeròbica de la DBO, aquest serà una funció de la concentració de microorganismes descomponedors, la concentració (i disponibilitat) de la matèria orgànica de la DBO a la seva proximitat i la concentració d'oxigen disponible per dur a terme la reacció. A l'apartat 3.4.3 es descriu com s'ha tractat matemàticament aquest conjunt.

Per a totes les simulacions subsegüents s'ha considerat una concentració de  $10^9$  cèl·lules actives per ml (corresponent a  $10^{15}$  cel·les/m<sup>3</sup> en unitats del S.I.). S'ha escollit aquesta concentració ja que es correspon amb concentracions que es poden obtenir fàcilment amb cultius rics en laboratori per a la seva fase estacionària.

El fet de treballar amb cultius en fase estacionària, simplifica i facilita el sistema a modelar, ja que en aquesta fase queda molt limitada la divisió cel·lular i presenta poques oscil·lacions en la riquesa d'organismes presents, fet que combinat amb el curt temps esperat de la prova ens ha permès no incloure models de divisió i creixement en les simulacions (Picioreanu et al. 2007).

En cas de considerar-se necessari, es podria incrementar aquesta concentració de la biomassa activa, per tal de o bé reduir el temps de l'anàlisi o bé incrementar la biomassa potencialment degradable per al mateix temps, tot i que això implica altres complicacions en el sentit d'obtenir la biomassa, que requereixen processos com la centrifugació, i de garantir que aquesta estigui activa en el moment de l'anàlisi (vegeu annex 7.2).

També cal destacar que en totes les simulacions que es presenten s'ha optat per una matèria orgànica de composició coneguda i simplificada, com és l'ús de glucosa. D'una banda, aquesta es degrada a acetat, que no és degradable pels organismes descomponedors considerats, i simplifica la simulació a una degradació d'un sol pas.

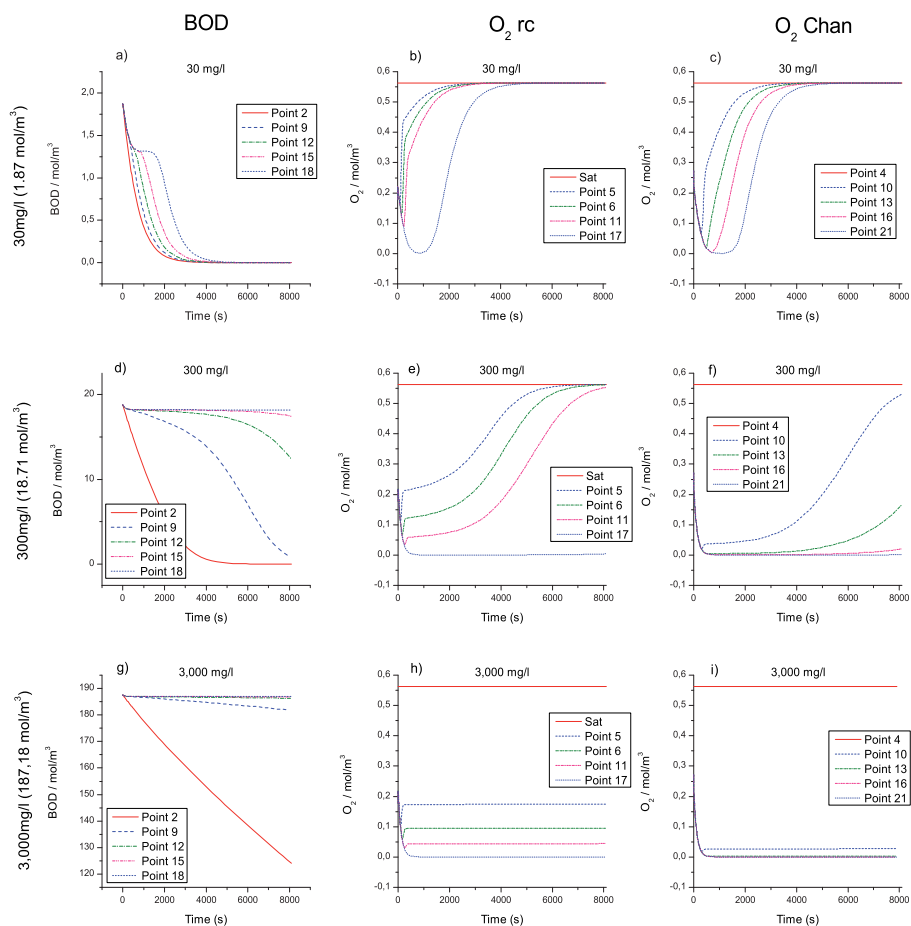
D'altra banda, tampoc s'ha considerat la presència d'altres compostos de major complexitat química, que requeriran per a la seva degradació l'activació d'altres vies metabòliques en els microorganismes encarregats de la descomposició i deixarien al medi una diversitat de compostos simples.

#### EFFECTE DE LA CÀRREGA ORGÀNICA

Al primer gràfic que comentem, es comparen tres simulacions que només difereixen en la càrrega orgànica en forma de DBO. Aquestes càrregues corresponen a 30, 300 i 3.000 mg/l de DBO, que com s'ha comentat són característiques de la qualitat exigida per a la sortida d'una EDAR abans de ser retornada al medi (30 mg/l), una aigua residual humana típica (300 mg/l) i

una aigua procedent d'una indústria amb residus orgànics (molt més variable, però establerta en 3.000 mg/l).

Per a les tres condicions considerades, s'ha establert un flux de l'electròlit de 0,15  $\mu\text{l}/\text{minut}$ . Aquest és un cabal baix, fins i tot difícil d'obtenir amb les bombes més utilitzades per a sistemes microfluídics.



Gràfic 3.2. Resultats de les simulacions Per a diferents concentracions de la DBO.  $O_2rc$ : cambra de reacció i  $O_2Chan$ : canal de l'electròlit.

Per a cadascuna de les simulacions es presenten tres gràfics, que són aquests:

1. Concentració de DBO a la cambra de reacció: s'hi representen gràficament 5 punts de la geometria: 9, 12 i 15, situats a la part central de la cambra de reacció, a diferents longituds del dispositiu, i 2 i 18, que corresponen al punt amb més fàcil accés a l'oxigen (punt 2, situat a la part superior de la cambra de reacció, al costat de l'entrada de l'electròlit) i al de major limitació al transport d'oxigen (punt 18, situat a l'extrem distal del dispositiu i a la part inferior de la cambra de reacció).
2. Concentració d'oxigen a la cambra de reacció: s'hi representen gràficament 4 punts, tots corresponents a la base de la cambra de reacció, a diferents distàncies de l'entrada del sistema. S'utilitzen punts de la base ja que corresponen a les situacions més limitants per al transport d'oxigen al sistema.
3. Concentració d'oxigen al canal de l'electròlit: s'hi representen gràficament 5 punts, situats a la part superior del canal pel qual circula l'electròlit. El punt 4 es

manté al nivell de saturació, ja que és emplaçat a l'entrada del dispositiu i, per tant, manté les condicions del líquid influent. El punt 21 està situat just a l'extrem distal del canal i reflecteix, per tant, la situació més limitant pel que fa a oxigen dissolt romanent. Aquest punt és altament rellevant ja que és molt pròxim a l'emplaçament de l'elèctrode de treball on es farà la mesura. Els altres punts (10, 13 i 16) són emplaçats a intervals regulars entre els dos punts anteriors i permeten de veure la dinàmica del conjunt.

Si observem el gràfic 3.2 (a), observem que el model prediu que s'arribaria a una completa degradació de la DBO en un termini d'uns 4.800 segons, però tot i tenir una degradació completa de la DBO, al gràfic 3.2 (b), que ens mostra la concentració d'oxigen a la cambra de reacció, veiem que al punt més limitant (punt 17) hi ha una situació de nivells molt baixos d'oxigen o microaerobiosi durant els primers 2.00 segons (el nivell d'oxigen es manté per sota dels 0,5 mM) que podria comportar una modificació dels organismes presents en aquesta àrea cap a vies metabòliques anaeròbiques i que, per tant, pot alterar les mesures del dispositiu.

Aquest efecte es veu encara de forma més acusada si observem les concentracions a la part superior del canal de l'electròlit gràfic 3.2 (c), que si bé no afecta el procés de degradació, permet determinar que hi ha una manca d'oxigen al sistema.

Els efectes aquí comentats són similars, però molt més acusats a les simulacions per a concentracions de la DBO de 300 i 3.000 mg/l. Així, en el cas de 300 mg/l observem que només es dona una bona degradació de la DBO present al punt més proximal del dispositiu (punt 2), mentre que en els punts 9 i 12 la degradació és molt parcial i en els punts més distals és quasi nul·la.

Aquesta mateixa anàlisi es pot fer per al gràfic 3.2 g, tot i que de forma molt més acusada, atès el major consum d'oxigen que comporta la major presència de DBO o matèria orgànica descomponible.

Si bé la majoria de dispositius de detecció ràpida de DBO no pretenen la completa degradació de la matèria orgànica durant el període de durada de l'anàlisi (Anon 2002), és evident que com més part pugui ser degradada durant el procés, més fiabilitat tindran les mesures obtingudes.

D'altra banda, observem que al gràfic 3.2 (e) hi ha zones de la cambra de reacció que no arriben a tenir un contingut significatiu d'oxigen durant tota la simulació (punt 17), fet que clarament afectarà la mesura. Al gràfic 3.2 (h), corresponent a 3.000 mg/l de DBO, això s'extrema.

També observem que per aquests dos casos de 300 i 3.000 mg/l de DBO, no obtenim concentracions significatives d'oxigen a la proximitat de l'elèctrode (punt 21), fet que impediria prendre'n mesures electroquímiques.

Aquest és un problema comú de la mesura de la DBO, (Anon 2002; Process 2011) ja que amb els mètodes estàndard, es disposa d'una quantitat limitada d'oxigen al sistema.

Així, una via per poder sobreposar-se a aquest entrebanc seria, com en els mètodes més utilitzats, fer diverses proves amb diferents dilucions de la mostra a analitzar i utilitzar les que estiguin dins d'uns rangs adequats.

Altrament, observem que els patrons són similars entre les diferents concentracions, amb un retard a la resposta com més concentració de DBO presentin, de manera que el problema es podria enfocar emplaçant diferents grups d'elèctrodes a diferents distàncies dels canals, i

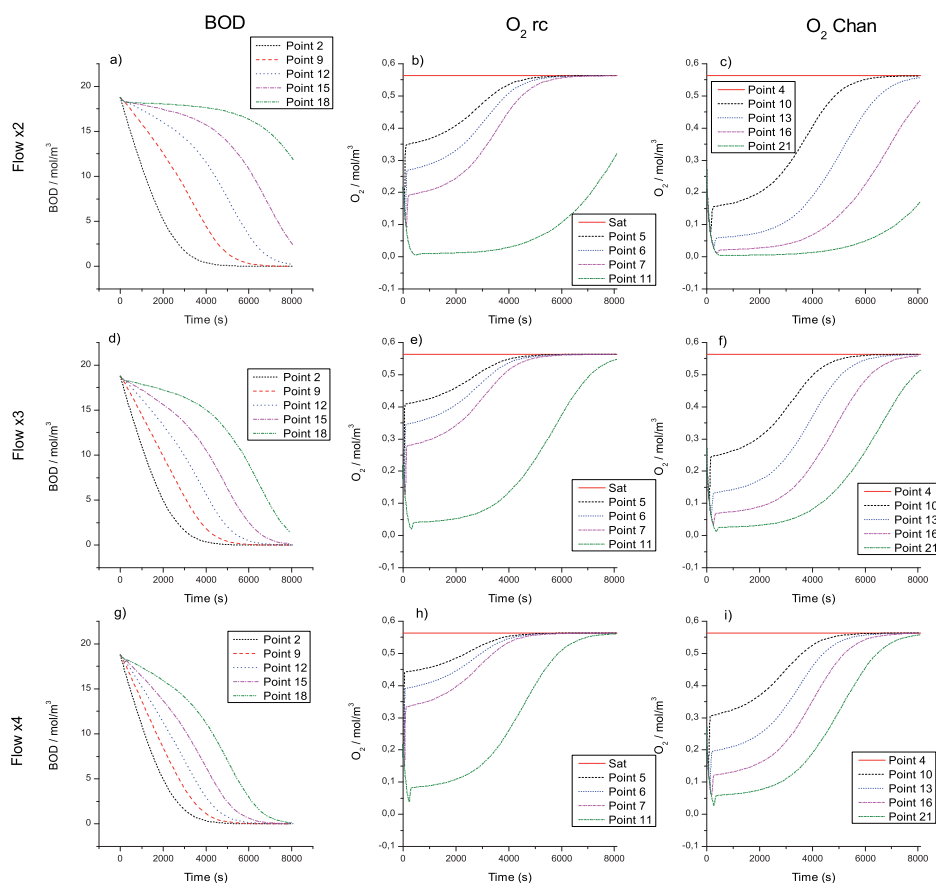
utilitzant elèctrodes més distals per a concentracions menors i proximals per a concentracions més elevades, incrementant així el rang vàlid de concentracions analitzables.

### SEGONS VELOCITAT DE FLUX

Tot i això, una de les característiques més importants del dispositiu dissenyat és que ens permet introduir oxigen al sistema, coneixent-ne la quantitat introduïda, ja que sabem la concentració de saturació d'oxigen i el volum introduït via el canal de l'electròlit. Això no és així per a la majoria dels dispositius de mesura de la DBO, i és un dels fets més rellevants de la patent del dispositiu (vegeu annex 7.2).

És a dir, si incrementem el flux de l'electròlit introduït al dispositiu, incrementarem així mateix el total d'oxigen aportat per al mateix temps d'anàlisi. A partir d'aquest principi, a continuació ens centrarem en el cas intermedi de concentració (300 mg/l), per al qual mantindrem tots els paràmetres prefixats, com a les simulacions anteriors, però modificarem el flux de l'electròlit, amb uns cabals de 0,3; 0,45 i 0,6 mul/min (és a dir, multiplicarem el flux inicial de 0,15 mul/min per 2, 3 i 4).

Al gràfic 3.3 es presenten els resultats d'aquestes noves condicions.



Gràfic 3.3. Resultats de les simulacions per a igual càrrega orgànica i diferents velocitats de flux.  $O_2rc$ : cambra de reacció i  $O_2Chan$ : canal de l'electròlit.

Una primera observació general és que els diferents gràfics presenten patrons similars, però que la resposta s'accelera a mesura que s'accelera el flux influent.

Pel que fa a la degradació de la DBO present (gràfic 3.3 a, d i g), veiem que per als dos cabals majors de l'electròlit ( $\times 3$  i  $\times 4$ ) hi ha una total o quasi degradació de la matèria orgànica present, tot i que com ja hem comentat aquest no és un factor limitant en si.

Si observem la concentració d'oxigen a la cambra de reacció, veiem que en el cas de menor cabal ( $\times 2$ ) hi ha una quantitat insuficient d'oxigen al punt més limitant (gràfic 3.3 b, punt 11), que es manté gairebé durant els primers 5.000 segons de la simulació, i que, per tant, pot comportar clarament l'activació de les vies metabòliques anaeròbiques amb els problemes ja comentats que això comporta de cara a la mesura.

En el cas de flux  $\times 3$ , només en fases molt inicials trobem concentracions per davall de 0,5 mM, tot i que després es manté en nivells no gaire superiors. A mesura que incrementem el cabal i, per tant, l'entrada d'oxigen al dispositiu, es prevé aquest problema potencial i al flux de  $\times 4$ , no es mostren nivells preocupants ni per la concentració ni per la durada.

En observar la concentració d'oxigen al canal de l'electròlit, les conclusions són similars, mentre que en el cas de menor cabal, gràfic 3.3 (c) trobem concentracions d'oxigen a la proximitat de l'elèctrode pròximes a zero durant els primers 4.000 segons simulats, fet que no ens permetria de conèixer la dinàmica d'oxigen durant tot aquest període; a mesura que incrementem l'oxigen introduït, anem obtenint majors nivells d'oxigen i conseqüentment del senyal elèctric detectable electroquímicament. Aprofundirem en aquests punt en l'apartat següent.

Per últim, en el cas amb un major cabal, gràfic 3.3 (flux  $\times 4$ ) observem que només als punts més distals (punt 11 al gràfic h i 21 al gràfic l) es donen concentracions puntuals d'oxigen per davall de 0,5 mM, i que la durada d'aquesta situació és breu (interval d'uns 20 i 100 segons, respectivament), per la qual cosa no sembla probable que hagin de tenir problemes a l'hora de iniciar l'activació de metabolismes anaerobis.

També cal destacar que es prediu una pràctica degradació del total de la glucosa (DBO) introduïda en el sistema en el lapse de temps analitzat de 8.100 segons, tot i que, com ja s'ha dit, això no és imprescindible per a la mesura del sensor.

### 3.7.3. DETECCIÓ ELECTROQUÍMICA DE L'OXIGEN

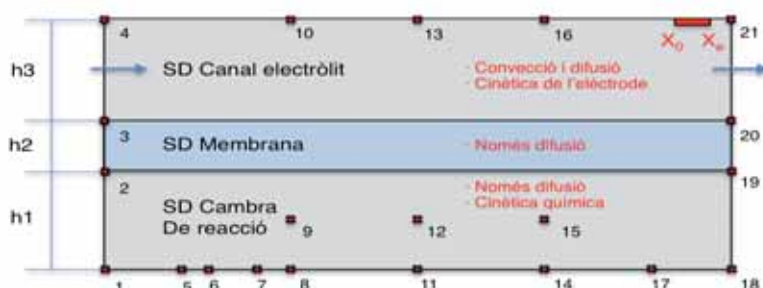


Figura 3.12: Esquema del model amb tots els mòduls activats.

Paràmetre	Descripció	Valor	Unitats
h1	Alçada de la cambra de reacció	50-100	$\mu\text{m}$
h2	Gruix de la membrana	25	$\mu\text{m}$
h3	Alçada del canal de l'electròlit	50-100	$\mu\text{m}$
L	Longitud total	0,05	m
$V_{in}$	Velocitat mitjana del flux	4, 8, 12, 16	$10^{-4}$ m/s
$C_{0\_O_2\_chan}$	Concentració inicial $O_2$ canal de l'electròlit	0,5631	mols/l
$C_{0\_O_2\_rc}$	Concentració inicial $O_2$ cambra de reacció	0	mols/l

$t$	Temps simulat	8,100	s
$C_0\_BOD$	Concentració inicial de la DBO	30, 300, 3,000	
	Model electroquímic	Sí	
	Nodes del mallat del model	$4,5 \cdot 10^5$	Unitats (1)

Taula 3.4: Condicions de les simulacions

Aquest darrer bloc de simulacions inclou com a principal diferència l'activació del model electroquímic de l'elèctrode de treball per a la detecció d'oxigen al final del canal de l'electròlit. S'ha decidit separar aquest bloc dels presentats anteriorment, ja que simular el comportament de l'elèctrode implica certa complexitat matemàtica i pràctica que comentem a continuació, mentre que no afecta sensiblement al procés en si de la degradació de la matèria orgànica, el flux de l'electròlit o les dinàmiques de l'oxigen que s'han comentat anteriorment.

La complexitat que implica el model electroquímic no es deu tant al model en si com a les diferències de magnitud en comparació als altres aspectes estudiats en les simulacions, i són:

- a) Diferència en l'escala dimensional: mentre que per a l'anàlisi dels models de flux i transport de masses, difusió d'oxigen i DBO i permeabilitat de les membranes hem pogut utilitzar mallats en la magnitud de micres, els canvis electroquímics esdevenen rellevants a escales molt menors, sobretot a la proximitat de la superfície de l'elèctrode, on es generen grans gradients de concentració a l'escala de nanòmetres.
- b) Diferència en l'escala temporal: aquests canvis acusats en els gradients i mantinguts en el temps impliquen també grans canvis en petites fraccions de temps que afecten principalment la concentració i estat d'oxidació de l'oxigen a la proximitat de l'elèctrode, de forma similar al que s'ha comentat per a tots els models, en referència a la dificultat d'establir els primers equilibris a partir de les condicions inicials, però en aquest cas al llarg de tot el temps de simulació del model (8.000 segons).

Aquests dos factors obliguen que, per tal d'obtenir un model estable de qualitat similar als anteriorment presentats, s'hagi hagut d'incrementar el nombre de nodes per un factor de  $\times 2$  a  $\times 4$  (segons el model que comparem). Cal esmentar, però, que aquest increment de nodes no és homogèniament repartit en tota la geometria, sinó que es concentra a les zones pròximes a l'elèctrode, ja que el funcionament general no varia excepte en aquest emplaçament.

En aquest apartat s'analitzaran diferents aspectes relacionats amb la mesura de l'elèctrode, que es comenten en els punts següents:

- a) Emplaçament de l'elèctrode de treball
- b) Intensitat del senyal elèctric esperat
- c) Afecte de l'alçada del canal (h3) respecte al transport d'oxigen:
- d) Afecte de l'alçada del canal (h3) respecte al consum d'oxigen:
- e) Emplaçament de més d'un elèctrode:

#### 3.7.4. EMPLAÇAMENT I FUNCIONAMENT DE L'ELÈCTRODE DE TREBALL

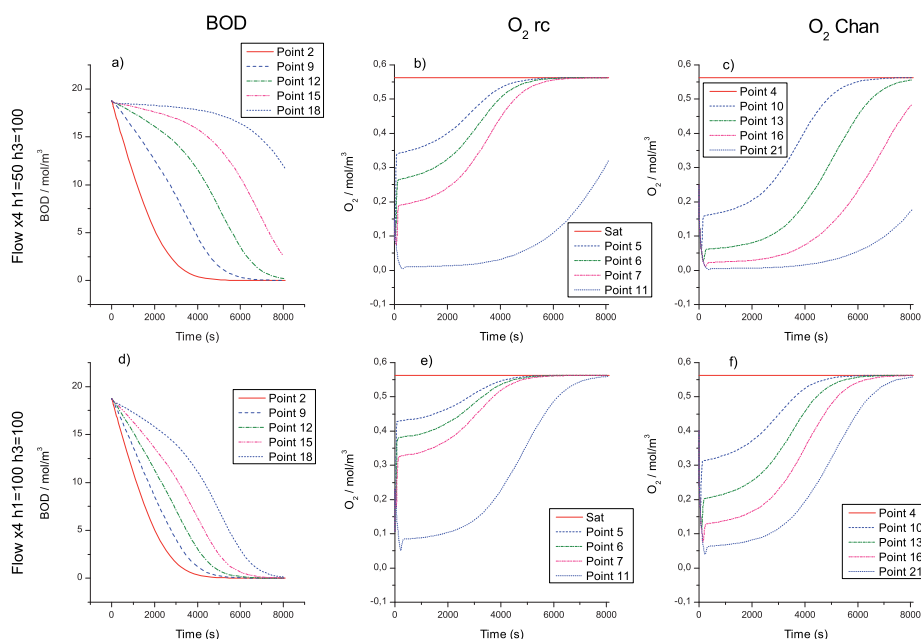
Com es comenta més extensament a l'apartat de fabricació (punt 4.2.1), els elèctrodes de treball i auxiliars utilitzats s'han fotolitografiat sobre diferents materials: plàstics (COP) pel fet de ser flexibles, vidre i silici. L'elèctrode i el material de suport formen part del xip que componen els circuits microfluídics del dispositiu com a tapa inferior.



Aquest enfocament fa que l'elèctrode quedi emplaçat a la part superior del canal de l'electròlit, és a dir, a la part més allunyada de la membrana de separació de la cambra de reacció on es dona el consum d'oxigen.

Idealment l'elèctrode es podria col·locar a la part basal del canal de l'electròlit, però això implica fabricar-lo sobre la superfície de la membrana de separació. Atesa la composició de la membrana i el procés de fabricació dels elèctrodes, ara per ara aquesta solució no s'ha vist viable. En aquest sentit, a continuació s'han intentat determinar mitjançant models les implicacions d'utilitzar canals de l'electròlit de major o menor alçada i que, per tant, incrementen la distància vertical entre el punt de consum d'oxigen a la cambra de reacció i l'elèctrode on serà detectat.

La primera comprovació que s'ha realitzat es presenta al gràfic 3.4. Com s'ha comentat a l'apartat de fluídica i al disseny del model, la microfluídica present al dispositiu té un comportament essencialment laminar, on els processos turbulents són irrellevants. Una implicació d'aquest fet és que el transport d'oxigen en l'eix vertical és principalment per difusió i, per tant, respon a un transport relativament lent, comparat amb els moviments convectius del circuit fluídica. Volem comprovar, doncs, com respon el dispositiu si incrementem el volum de la cambra de reacció (duplicuem  $h_1$  de 50 a 100 micres) i mantenim el del canal de l'electròlit. D'altra banda, construïm també un altre model on ambdós canals, la cambra de reacció i el canal de l'electròlit, els incrementem a 100 micres ( $h_1 = h_3 = 100$  micres).



Gràfic 3.4. Resultats de les simulacions per a diferents alçades del canal de l'electròlit i la cambra de reacció.

Al gràfic 3.4, es comparen dos models. El primer té un canal per a l'electròlit d'una alçada igual als presentats anteriorment (50 micres) i una cambra de reacció del doble de volum (100 micres en lloc de 50 micres), i es compara amb un model en què tant el canal de l'electròlit com la cambra de reacció són de 100 micres d'alçada. La resta de condicions es mantenen iguals, però s'ha mantingut la velocitat del flux, fet que implica en el cas inferior del gràfic incrementar

el cabal influent al doble. Així, el model superior del gràfic (canal de 50 micres) té un cabal de 0,6 ml/min i l'inferior, d'1,2 ml/min.

En el primer cas (gràfic 3.4 *a, b i c*), observem un patró alentit respecte al cas d'igual flux de la figura 5 (gràfic 3.4 *g, h i l*), atesa la major proporció de la cambra de reacció (on es dona el consum) respecte al canal de l'electròlit, que té una resposta similar al cas de *flow x2* de la gràfic 3.4 (*a, b i c*).

D'altra banda, quan mirem els resultats per a un model de 100 micres d'alçada, tant al canal de l'electròlit com a la cambra de reacció, veiem uns resultats molt similars als del cas amb més flux del gràfic 3.3, amb un molt lleuger retard que seria atribuïble al transport de l'oxigen per difusió per un canal més alt.

Sembla, doncs, que per alçades de canal d'aquestes magnituds no hi ha diferències significatives en el rang observat i, per tant, si en calgués la fabricació es podria treballar amb els dos gruixos de canals estudiats indistintament.

### 3.7.5. CONSUM D'OXIGEN A LA SUPERFÍCIE DE L'ELÈCTRODE I L'ÚS DE MÚLTIPLES ELÈCTRODES

El dispositiu simulat es basa en mesures respiromètriques que consisteixen a monitoritzar els canvis en la concentració d'oxigen en un elèctrode emplaçat al final del canal de l'electròlit. Però la detecció electroquímica es fa mitjançant la mesura del corrent de reducció de l'oxigen romanent al canal, de manera que és consumit en certa quantitat durant la mesura. Aquest consum de l'oxigen present és normalment negligible en dispositius d'escala macroscòpica, però pot arribar a ser rellevant quan treballem en sistemes microfluídics i escales microscòpiques.

Conèixer la magnitud d'aquest consum tindrà implicacions rellevants pel disseny del dispositiu. Per tal d'analitzar-ho s'han construït models simplificats que inclouen el sistema de mesura electroquímica amb un elèctrode de 75 micres i el canal de l'electròlit, saturat d'oxigen, amb alçades de 50, 100 i 150 micres per una longitud de 2 mm.

A la figura 3.13 observem que tot i partir d'una situació òptima en què l'electròlit es troba a concentració de saturació en el contingut d'oxigen, el consum d'oxigen causat per la reacció de reducció a la superfície de l'elèctrode és rellevant i en alguns casos molt considerable.

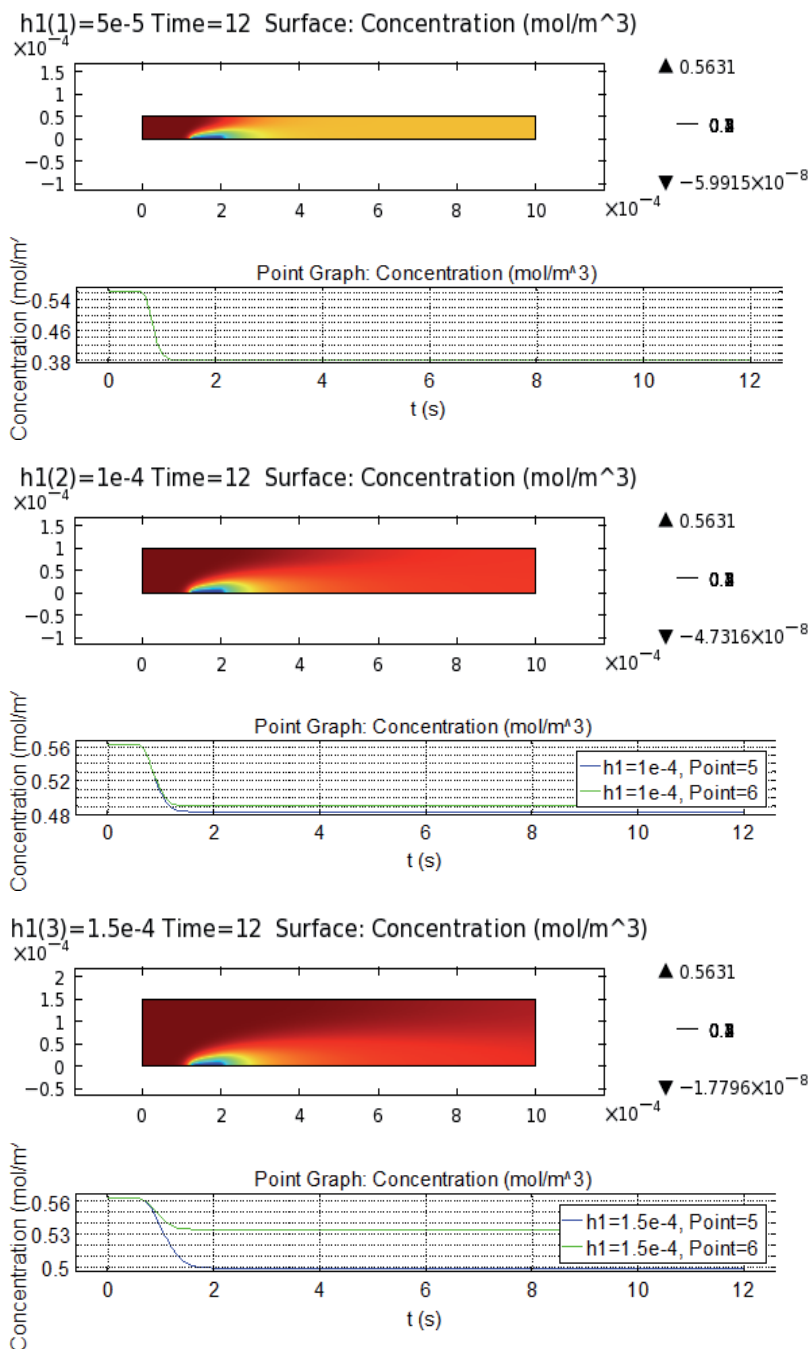


Figura 3.8. Esquema del consum d'oxigen i gràfic de l'oxigen romanent per a diferents alçades del canal de l'electròlit. Totes les simulacions consideren una concentració d'oxigen de saturació a la proximitat de l'elèctrode.

En el primer cas (a,  $h_3 = 50$  micres) el consum d'oxigen atribuïble a la mesura electroquímica arriba a ser del 57%, que pot ser un problema greu per a certes configuracions previstes del dispositiu.

En els casos de major alçada del canal (b i c,  $h_3 = 100$  i  $150$  micres), aquest efecte és matisat a causa de la major quantitat d'oxigen al sistema i els valors d'oxigen consumit ja se situen a nivells del 24 i 18%, respectivament.

El consum d'oxigen durant la mesura no respon a una disminució lineal a mesura que incrementem l'alçada del canal, ja que el transport difusiu és proporcional al gradient de

concentració i, per tant, una major velocitat de transport cap a l'elèctrode. Com a conseqüència d'això la resposta en percentatge de l'oxigen consumit a l'elèctrode a mesura que incrementem l'alçada del canal respon a una exponencial negativa asimptòtica.

Si bé això no és un problema en si per al dispositiu dissenyat, ja que aquest emplaça l'elèctrode al final del dispositiu i, per tant, el consum d'oxigen no manleva aquest element de la cambra de reacció, sí que és un resultat interessant per tenir en compte en mesures electroquímiques en sistemes microflúidics.

Aquest efecte sí que és rellevant, però, si ens plantegem de posar elèctrodes seriatos a diferents longituds del dispositiu, que és una idea treballada a nivell de disseny, això permetria dues solucions teòricament molt interessants:

- a) Obtenir diferents mesures d'una sola analítica: això permetria tenir repeticions en un sol dispositiu, que o bé corregissin la mesura, o bé permetessin d'identificar un elèctrode defectuós en cas de no concordar les diferents mesures.
- b) Incrementar el rang vàlid de mesura del dispositiu: ja que tenint mesures a diferents distàncies, podríem seleccionar la mesura que es trobés més ben situada en el rang vàlid de mesura, amb un sol experiment.

Per exemple, un dispositiu amb tres elèctrodes permetria agafar la mesura més distal en el cas de mostres poc carregades, on hi hagués poc consum d'oxigen, les proximals en mostres més carregades on l'oxigen es consumís de tal manera que no es detectés als elèctrodes més distals o combinant mesures de més d'un elèctrode en mostres de càrrega intermèdia i tenint repeticions de comprovació. De fet equivaldria a tenir cambres de reacció de diferents longituds/volums en un sol canal i dispositiu.

Aquest enfocament no és descartable, ja que si es considera interessant es pot ajustar principalment amb dues vies:

- a) El model considera una mesura contínua de l'elèctrode, però en si el potenciòstat realitza cicles discrets seqüencials per obtenir la mesura contínua. Incrementar l'interval d'aquestes mesures seqüencials implicarà, per tant, un menor consum d'oxigen.
- b) Atès que hi ha una relació directa entre la mesura obtinguda i l'oxigen consumit (reduït), es pot considerar en el logaritme de control i separar aquest consum del consum resultat de l'activitat microbiana, corregint el resultat.

Un altre aspecte rellevant que podem extreure de la figura 3.13, és que ens permet aproximar la distància, a partir del punt de consum d'oxigen, que tarda a homogeneïtzar-se la concentració d'oxigen en el seu eix vertical, per a una velocitat de flux determinada.

Veiem que, efectivament, a major alçada del canal requereix més distància (i, per tant, temps) per presentar una concentració homogènia en l'eix vertical. Així, al cas del canal de 50 micres, trobem la mescla homogènia a escassament 0,5 mm del final de l'elèctrode, mentre que per a 100 micres i 150 micres aquesta mescla s'incrementa a 0,75 mm i a més d'un mil·límetre, respectivament.

Aquesta distància és directament proporcional tant al l'alçada del canal com a la velocitat del flux dins del canal, i ens dóna una idea que per treballar amb transport exclusiu per difusió serà rellevant tant mantenir alçades de canal relativament petites com validar el rang de velocitats de flux adequades.

### 3.8. CONCLUSIONS

Conclusions de les eines de simulació:

- i. La simulació pot ser una eina rellevant ja en la fase de disseny i no sols a la fase de contrast de resultats, on és més usualment utilitzada.
- ii. Una simulació acurada permet detectar i aproximar els principals colls d'ampolla i constriccions del disseny.
- iii. La simulació durant el disseny permet tenir respostes quantitatives abans de la fabricació, entre les que destaquem aquestes per al cas en estudi:
  - a. Dimensions del canal en longitud, i alçades.
  - b. Requeriments que han de complir les membranes.
  - c. Definició de la geometria.
  - d. Rang viable de velocitats de flux.
  - e. Emplaçament òptim dels sensors.
- iv. Les simulacions són, per tant, un element rellevant durant el disseny i prototipatge, que permet una optimització de recursos i temps.
- v. En les fases prèvies i preparatòries del disseny, s'han analitzat mitjançant les simulacions diferents aspectes rellevants abans del prototipatge, com són:
  - a. Cambra de reacció (estàtica) o canal de reacció (amb moviment).
  - b. Dispositiu amb una cambra que permetés l'agitació de la mescla o canal suficientment petit com per estalviar els mecanismes d'agitació.
  - c. Longitud dels canals en funció de la permeabilitat a l'oxigen de les membranes i la quantitat d'oxigen introduït al sistema.
  - d. Comparació de sistemes amb i sense agitació.

Conclusions del dispositiu dissenyat:

- vi. El transport d'oxigen a través de la membrana de separació és un element clau i constrictiu del dispositiu dissenyat.
- vii. El disseny de dos canals separats per una membrana, millora el senyal captat per l'elèctrode, a la vegada que permet disposar d'una superfície molt més gran de bescanvi d'oxigen entre la cambra de reacció i l'electròlit on es fa la mesura.
- viii. Així mateix, ofereix una bona protecció a la passivació de l'elèctrode, sense utilitzar membranes de PTFE directament dipositades sobre l'elèctrode.
- ix. El dispositiu permet treballar amb volums molt petits de mostra.
  - x. Treballar amb un canal de l'electròlit amb flux, permet controlar la quantitat d'oxigen aportada al sistema i, per tant, també, adaptar el mateix dispositiu a diferents condicions, com la concentració de matèria orgànica de cada mostra.
  - xi. Aquesta configuració permet adaptar el dispositiu a un gran rang de situacions.
  - xii. Aquesta adaptació del dispositiu a diferents concentracions, és fàcilment automatitzable.
- xiii. La configuració adoptada, presenta un nou enfocament que permet adaptar el principi a noves aplicacions, com detecció de toxicitat o anàlisi de mostres biològiques complexes com les sanguínies. (Vegeu la patent a l'annex 7.2.)
- xiv. Treballar amb altes concentracions de microorganismes permet reduir significativament la durada de l'anàlisi per a similars resultats.
- xv. La mida del dispositiu el fa fàcilment integrable en un esquema de *lab-on-a-chip*, amb elements com una font elèctrica per a les mesures electroquímiques, sistemes de bombeig, o instal·lar més d'un dispositiu per fer simultàniament proves blanc o repeticions de la mesura.

- xvi. El dispositiu es pot adaptar a fer anàlisis in situ, evitant els problemes d'estabilitat de la mostra durant el transport i temps de preparació.

Conclusions de la mesura electroquímica:

- xvii. La mesura electroquímica és destructiva (consumeix l'element a analitzar).
- xviii. En sistemes microanalítics aquest consum té una rellevància que a escales més grans és negligible i cal ser considerat.
- xix. Com que el dispositiu treballa per difusió i sense agitació, s'observen diferències significatives en la composició de l'electròlit en l'eix vertical (y).
- xx. Seria òptim desenvolupar dissenys que permetin emplaçar els elèctrodes de mesura a la mateixa membrana de separació, ja que milloraria la sensibilitat del dispositiu.
- xxi. Emplaçar més d'un elèctrode de mesura al canal de l'electròlit pot aportar millores, com una millor adaptació a diferents concentracions de DBO de la mostra o tenir repeticions en una sola anàlisi, però caldrà considerar molt acuradament el consum d'oxigen causat per la mateixa mesura.

### 3.9. BIBLOGRAFIA

- Allen, J. & Bard, L.R.F., 2001. *ELECTROCHEMICAL METHODS. Fundamentals and Applications* 2nd ed., New York: John Wiley & sons.
- Anon, 2002. Microbial BOD sensors for wastewater analysis., 36(15), pp.3786–3802.
- Atkins, 2002. *Physical chemistry* Atkins, ed., Oxford University Press.
- Basant, N. et al., 2010. Linear and nonlinear modeling for simultaneous prediction of dissolved oxygen and biochemical oxygen demand of the surface water — A case study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 104(2), pp.172–180.
- Bihlo, A. & Haynes, R.D., Parallel stochastic methods for PDE based grid generation. *Computers & Mathematics with Applications*, 68(8), pp.804–820.
- Clochard, M.C. et al., 2010. Ion track grafting: A way of producing low-cost and highly proton conductive membranes for fuel cell applications. *Journal of Power Sources*, 195(1), pp.223–231.
- Compton, R.G. & Banks, C.E., *Understanding Voltametry*, World Scientific Publishing Company.
- Cooper, J.A. & Compton, R.G., 1998. Channel Electrodes — A Review. *Electroanalysis*, 10(3), pp.141–155.
- Cox, M.E. & Dunn, B., 1986. Oxygen diffusion in poly(dimethyl siloxane) using fluorescence quenching. I. Measurement technique and analysis. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 24(4), pp.621–636.
- Dickinson, E.J.F., Ekström, H. & Fontes, E., 2014. COMSOL Multiphysics®: Finite element software for electrochemical analysis. A mini-review. *Electrochemistry Communications*, 40, pp.71–74.
- Edenhofer, O. & Seyboth, K., 2013. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). In J. F. Shogren, ed. *Encyclopedia of Energy, Natural Resource, and Environmental Economics*. Encyclopedia of Energy, Natural Resource, and Environmental Economics. Waltham: Elsevier, pp. 48–56.
- Evans, N.T. & Quinton, T.H., 1978. Permeability and diffusion coefficient of oxygen in membranes for oxygen electrodes. *Respiration physiology*, 35(1), pp.89–99.
- Folger, H.S., *Elements of Chemical Reaction Engineering* Fourth, Pearson.
- Godino Amado, N. et al., 2010. *Design and fabrication of miniaturised electroanalytical systems*, Universitat Autònoma de Barcelona. Available at: <http://ddd.uab.cat/record/68249>.
- Godino, N. et al., 2008. Measuring acute toxicity using a solid-state microrespirometer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 135(1), pp.13–20.
- Lehtinen, T. et al., 1998. Electrochemical characterization of PVDF-based proton conducting membranes for fuel cells. *Electrochimica Acta*, 43(12-13), pp.1881–1890.
- Limon-Petersen, J.G. et al., 2009. Quantitative Voltammetry in Weakly Supported Media: Effects of the Applied Overpotential and Supporting Electrolyte Concentration on the One Electron Oxidation of Ferrocene in Acetonitrile. *J. Phys. Chem. C*, 113(1), pp.333–337.
- Liu, W.K. et al., 2006. Immersed finite element method and its applications to biological systems. *A Tribute to Thomas J.R. Hughes on the Occasion of his 60th Birthday*, 195(13–

16), pp.1722–1749.

Maoyu, Y., 1990. An autocatalytic model for the kinetics of BOD test. *Water research*, 24(9), pp.1091–1095.

McLaughlin, M., *A tutorial on mathematical modeling*, Dr. Michael P. McLaughlin. Available at: [http://www.causascientia.org/math\\_stat/Tutorial.pdf](http://www.causascientia.org/math_stat/Tutorial.pdf).

Menshykau, D., Batchelor-McAuley, C. & Compton, R.G., 2011. Journal of Electroanalytical Chemistry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 651(2), pp.118–130.

Ordeig, O. et al., 2007. Electroanalysis Utilizing Amperometric Microdisk Electrode Arrays. *Electroanalysis*, 19(19-20), pp.1973–1986.

Picioreanu, C. et al., 2007. A computational model for biofilm-based microbial fuel cells. *Water research*, 41(13), pp.2921–2940.

Picioreanu, C. et al., 2010. *Bioelectrochemistry*. 78(1), pp.8–24.

Process, I.T.G.O.R.I.C.O.T.A.S., 2011. *Respirometry in Control of the Activated Sludge Process: Benchmarking Control Strategies* 2002nd ed. J. B. C. H. S. P. A. Vanrolleghem, ed., IWA Publishing.

Streeter, I. & Compton, R.G., 2008. Numerical Simulation of Potential Step Chronoamperometry at Low Concentrations of Supporting Electrolyte. *J. Phys. Chem. C*, 112(35), pp.13716–13728.

Ullah, M.Z. et al., 2015. Higher order multi-step iterative method for computing the numerical solution of systems of nonlinear equations: Application to nonlinear PDEs and ODEs. *Applied Mathematics and Computation*, 269, pp.972–987.

Wang, J., 2000. *Analytical Electrochemistry*

2nd ed., Wiley-VCH.

Yasukawa, T., Goto, K. & Mizutani, F., 2010. Determination of the Apparent Michaelis Constant of Glucose Oxidase Immobilized on a Microelectrode with Respect to Oxygen. *Electroanalysis*, 22(9), pp.927–930.

Zimmerman, W.B.J., 2006. *Multiphysics Modelling with Finite Element Methods*.



## 4. PROTOTIPATGE I FABRICACIÓ

### 4.1. INTRODUCCIÓ

En aquest apartat es tractaran les tècniques emprades per la fabricació del dispositiu de mesura ràpida de la DBO, així com la caracterització dels diferents elements que componen el sistema.

En l'apartat 4.2 de tècniques de fabricació, es diferencien dos blocs en funció de les tècniques: la microfabricació quan són elements fabricats en un entorn de sala blanca i el prototipatge ràpid quan són elements fabricats mitjançant diferents tècniques de fabricació convencionals. Aquesta és, per tant, una diferenciació que es refereix no tan sols a aspectes de les mides o de la precisió dels elements fabricats, sinó sobretot a altres implicacions, com són temps requerit per al desenvolupament, el cost i la versatilitat.

Posteriorment, a l'apartat 4.3 s'hi descriu de forma seqüencial la instal·lació experimental d'un sensor, així com les variacions que s'han anat introduint en diferents elements per resoldre aspectes conflictius o millorar el sistema.

Als apartats següents s'hi caracteritzen els diferents elements fabricats i s'hi descriuen les proves experimentals dutes a terme per comprovar la viabilitat del sistema desenvolupat.

## 4.2. TECNOLOGIES

### 4.2.1. MICROFABRICACIÓ

Anomenem en aquest treball *tècniques de microfabricació* totes les tècniques utilitzades que requereixen un ambient net i controlat (sala blanca) per a la seva fabricació.

Una sala blanca és un laboratori d'ambient controlat on, mitjançant diferents tractaments i protocols, es garanteix un ambient estable (en temperatura, humitat o fluxos laminars d'aire per evitar partícules) i una presència màxima de partícules alienes al procés. Això s'assoleix tant per mecanismes físics i químics, per exemple donar una sobrepressió que eviti l'entrada d'elements externs a la zona de treball, com per processos de protocol en el control de l'entrada d'elements externs al sistema, per exemple l'ús de roba especial que no generi partícules, minimitzant l'entrada d'elements externs, des d'un bolígraf fins a reactius o estris de laboratori.

Essencialment, de tot el dispositiu, a sala blanca només s'han fabricat els elèctrodes utilitzats per a la detecció electroquímica de l'oxigen.



Figura 4.1. Diferents àrees de treball de la sala blanca de l'IMB-CNM on s'han fabricat els elèctrodes. L'ambient net i controlat d'aquestes instal·lacions permet emprar tècniques de micro i nanofabricació.

Si bé és cert que en general el nivell de precisió dels elements fabricats és major amb les tècniques de microfabricació que amb les de prototipatge ràpid, ja que es pot treballar amb capes fines d'especificacions submicromètriques (**aspecte rellevant en microfluídica REF**) i fins i tot nanomètriques en alguns eixos, el prototipatge ràpid té, per contra, alguns avantatges com són:

- Un menor cost de fabricació, tant pel cost de la maquinària emprada, com pel requeriment de treball especialitzat i les restriccions de protocol de la sala blanca.
- Una major versatilitat i rapidesa de fabricació, ja que la detecció d'errors o i la introducció de millores al disseny es pot resoldre en el termini d'unes hores i no requereix redefinir explícitament tot el protocol i reiniciar un llarg procés d'espera per a una futura fabricació.
- Una precisió suficient per a molts dels elements requerits en el dispositiu, la qual ha incrementat significativament en els darrers anys. Actualment es poden donar especificacions de poques micres per a gairebé tots els processos que hem utilitzat, les quals són suficients en apartats com la carcassa, les connexions elèctriques i hidràuliques o els canals microfluídics.
- La possibilitat de treballar amb una major varietat de materials ja que no és tant sensible a contaminacions.

És per això que de tots els elements fabricats per a la construcció del microrespiròmetre hem limitat els processos que requereixen l'ús de sala blanca a aquells imprescindibles, que en el nostre cas són la fabricació dels microelèctrodes utilitzats per realitzar les mesures electroquímiques al canal de l'electròlit.

#### MATERIALS I PROCESAT DELS MICROELÈCTRODES

La fabricació dels elèctrodes implica diferents aspectes més o menys independents entre ells com són:

Disseny dels elèctrodes: quin nombre d'elèctrodes es necessiten, on i com es fan les connexions elèctriques que el connecten al potenciòstat per fer les mesures, quina mida té el conjunt i com es posicionen sobre l'espai de treball (en el nostre cas, una oblia de 4" de diàmetre).

Material de l'elèctrode: els elèctrodes per a proves electroquímiques es poden fer amb diferents materials conductors, com són els metalls o compostos de carboni (Godino Amado et al. 2010). En el nostre cas, hem utilitzat elèctrodes d'or i de platí, ja que eren elements comunament utilitzats a la bibliografia per a mesures d'oxigen, atès que permeten la reducció de l'oxigen sense requerir grans sobrepotencials {ELAN:ELAN141}.

Material d'unió suport elèctrode: són els materials que tenen unes bones característiques d'adhesió tant al material de suport com al material amb què està fabricat l'elèctrode. Per experiències prèvies en la fabricació de la sala blanca, s'ha optat per l'ús de crom en els elèctrodes de platí i de titani en els d'or.

Material de suport: si bé històricament els processos de microfabricació s'han realitzat sobre oblies de silici, en els darrers anys s'han adaptat els mateixos procediments per fabricar aquests elements en una varietat de materials de suport. D'entre aquests, hem utilitzat suports per als elèctrodes de silici, vidre i COP (*Cyclo Olefin Polymer*). Aquest darrer té diverses característiques que el fan interessant per al dispositiu dissenyat:

- a) Té una baixa permeabilitat als gasos, i especialment a l'oxigen.
- b) Presenta una bona resistència química, tant en el sentit d'alliberar compostos al medi com pel que fa a veure's alterat per compostos externs.
- c) Té una bona adherència de metalls, facilitant el gravat dels elèctrodes.
- d) És un material transparent que permet avaluar l'estat dels elèctrodes i les conduccions hidràuliques durant l'ús del xip.
- e) És un material amb certa flexibilitat que el fa menys delicat a l'hora de inserir-lo en una carcassa rígida o de transportar-lo al lloc d'anàlisi.
- f) És un material de cost competitiu.

En un primer disseny, es va considerar convenient incloure el màxim d'elements que donessin versatilitat al conjunt d'elèctrodes tot i que, com es comenta en l'apartat de validació dels dispositius, posteriorment s'ha anat simplificant el sistema i complementant amb elements externs que ens donaven millors resultats experimentals.

Inicialment, es va considerar convenient incloure dos sets complets de tres elèctrodes que permetessin fer la mesura de l'oxigen a l'inici i al final del canal de l'electròlit. A les figures 4.2 i 4.3 es pot veure la disposició dels elèctrodes sobreposats a l'oblia de fabricació i el detall d'un conjunt d'elèctrodes. El material sobre el qual es fabriquen els elèctrodes servirà també de suport per als circuits microfluídics, i les dimensions de cada conjunt d'elèctrodes són de 20 per 40 mm.

Un set d'elèctrodes es compon dels tres elèctrodes necessaris per a la realització de les proves electroquímiques: elèctrode de treball, contraelèctrode i elèctrode de referència, aquest darrer de major àrea ( $\times 3$ ) per tal que no sigui limitant en el pas dels corrents. L'àrea dels dos primers és de 2.200 micres d'amplada i 500 micres de longitud, mentre que el darrer té 1.500 micres de longitud.

La separació entre elèctrodes és en tots els casos de 500 micres. Si bé l'amplada és de 2.200 micres, aquesta queda limitada pel canal microfluídic, que serà de menor dimensió (s'ha treballat amb canals de 500 i 1.000 micres), ja que la reacció només es donarà on hi hagi presència d'oxigen i no a les zones segellades per l'adhesiu.

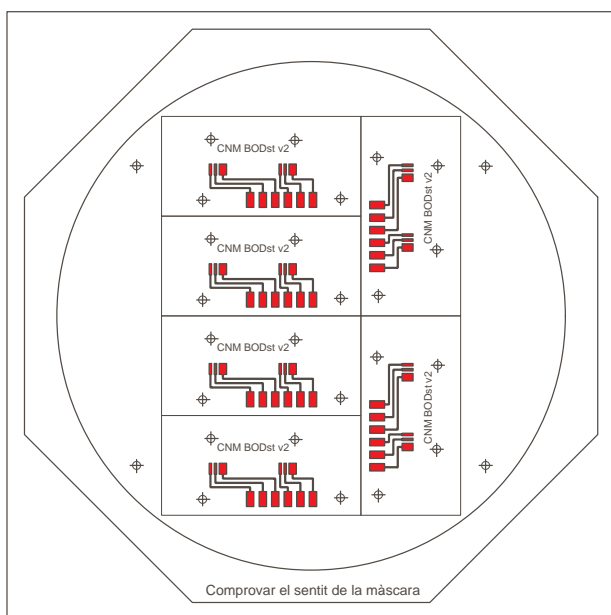


Figura 4.2. Esquema dels elèctrodes. Màscara utilitzada per fabricar els elèctrodes. L'oblia té un diàmetre de 102 mm o 4 polzades.

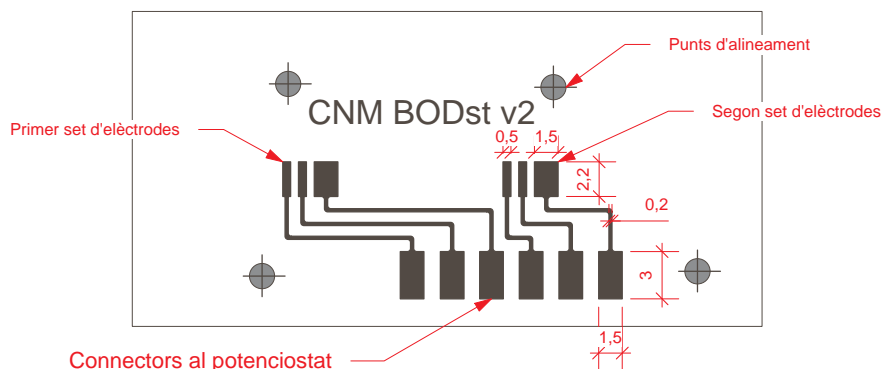


Figura 4.3. Detall d'un conjunt d'elèctrodes. El conjunt es fabrica sobre una superfície de 20 x 40 mm (marc exterior).

Cadascun dels elèctrodes té continuïtat elèctrica fins a un connector elèctric que permet la comunicació amb el potenciostat extern amb el qual es realitzen les mesures. Aquests connectors elèctrics estan fabricats amb els mateixos materials que els elèctrodes i tenen una amplada mínima de 200 micres.

## PROCESSAT DELS ELÈCTRODES

Tot i que s'ha treballat amb diferents materials de suport i metalls per a la fabricació dels elèctrodes, el processat a sala blanca ha estat similar per a tots.




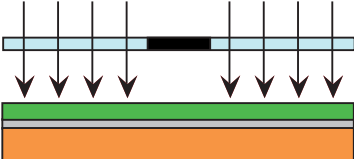
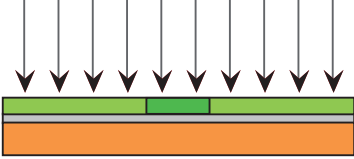



- A la figura 4.4, s'hi detallen les principals etapes del procés.
- 1) 
  - 2) 
  - 3.1) 
  - 3.2) 
  - 3.3) 
  - 3.4) 
  - 4) 
  - 5) 

Figura 4.4 Passos de la fabricació dels elèctrodes a sala blanca

1. Després de netejar les oblies, aquestes estan preparades per iniciar el gravat dels elèctrodes.

2. En les oblies de silici (aquest pas no és necessari per al les oblies de COP) es provoca una oxidació tèrmica de la superfície de treball per tal de tenir una superfície aïllada elèctricament perquè no interfereixi en processos posteriors.

3. Transferència de la imatge de la màscara:

3.1. Es diposita una fotoresina d'inversió sobre la superfície de les oblies que permeti realitzar posteriorment el *lift-off*.

3.2. Es cobreix el conjunt amb la màscara que porta impresos els motius que es volen gravar, en el nostre cas, els elèctrodes, els connectors elèctrics i els elements necessaris per muntar el circuit.

La màscara utilitzada és de camp clar, ja que els motius són negres i el fons transparent. I el conjunt s'exposa a la llum, fet que provoca modificacions en la resina exposada.

3.3. Es fa una cocció suau (*soft bake*) i s'exposa tota la resina a la llum. Amb aquesta operació s'aconsegueix una inversió de la polaritat de la imatge transferida.

3.4. Es fa el revelat, que extreu la resina de les zones on no hi havia hagut exposició a la llum a la etapa 3.2, mantenint la resta de la resina.

4. Es procedeix a la metal·lització mitjançant elèctrodes. Aquesta metal·lització varia en funció del material de suport i del material de l'elèctrode:

4.1. Oblies de silici amb elèctrodes de Pt: es metal·litzen primer 15 nanòmetres de Ti que faciliten l'adhesió del platí, del qual se'n fa una capa de 150 nanòmetres.

4.2. Oblies de COP amb Pt: similar a l'anterior, es fa una primera capa d'unió amb Ti de 10 nm i posteriorment s'hi diposita una capa de Pt de 100 nm.

4.3. Oblies de COP amb Au: en aquest cas es fa una doble capa d'unió, així primer s'hi diposita una capa de Ti de 15 nm, després, una segona de Ni també de 15 nm i sobre el Ni, la capa de Au de 150 nm.

5. Es retira la resta de la resina i les capes metàl·liques que hi ha sobre seu amb un procés de *lift-off*, i es neteja l'oblia ja acabada. Posteriorment es tallen els

diferents conjunts d'elèctrodes que conté la màscara.

#### MATERIALS DE SUPORT

Com s'ha comentat anteriorment, s'han utilitzat 3 materials com a suport dels elèctrodes. D'aquests materials dos eren rígids (vidre i silici) i un, flexible (COP).

Inicialment hi va haver problemes amb els suports rígids, en el moment d'instal·lar-los a la carcassa del dispositiu: a causa del seu disseny, s'havia d'aplicar certa pressió per tal de garantir l'estanqueïtat de les diferents connexions fluídiques del sistema.

Aquests problemes inicials es van resoldre ajustant millor la pressió exercida i canviant les juntes d'unió de juntes tòriques comercials per juntes autofabricades de silicona, que disposaven d'una major àrea de contacte entre la junta i el xip (conjunt de suport dels elèctrodes, membranes per fer els canals microfluídics i tapes), distribuint millor les zones de pressió i reduint la força exercida per àrea de superfície.

Aquest problema no es donava amb els xips muntats sobre suport de COP, però es van mantenir les millores comentades igualment.

Finalment, l'ús d'un material de suport o un altre ha estat més relacionat amb altres aspectes que amb la viabilitat en si dels tres materials testats, com es comenta en el punt següent. Per tant, considerem vàlids per al disseny proposat l'ús dels tres materials assajats, i les seves restriccions en un futur dependran més d'aspectes com l'econòmic o la durabilitat del xip que de la composició del material de suport.

#### RESULTATS DELS ELÈCTRODES

D'acord amb la bibliografia consultada (Godino Amado et al. 2010; Ordeig et al. 2007), tant els elèctrodes d'or com els de platí són adequats per a la detecció d'oxigen, i no presenten diferències destacables ni en aspectes negatius de cost ni de durabilitat. Com que el valor de potencial al qual es dona la reducció i l'oxidació d'un element determinat depèn, en part, de les característiques dels elèctrodes, com és el material de què estan compostos, i en alguns casos, com és el de l'oxigen, de factors ambientals, com la composició i el pH del medi, aquest potencial variarà lleugerament segons el material utilitzat, el pH de la mescla i també el potencial a què es redueixin altres elements que tinguin potencials de reducció pròxims a l'oxigen, que és un dels elements principals per evitar la presència de compostos orgànics a la superfície de l'elèctrode, ja que són molt diversos i alguns poden patir canvis de l'estat d'oxidació que incrementaran el soroll de la mesura. L'altre factor per evitar-los són els processos de passivació dels elèctrodes que ja s'han comentat.

Material	Suport	Observacions
Au/Cr	COP	Primeres proves, presenten poca durabilitat ja que l'or es pela al cap d'unes hores de treball, de manera que el crom queda a la vista. Tardor del 2012.
Pt/Ti	COP	Presenten algun problema de fabricació. Baixa adhesió del titani a la superfície de suport (COP). Gener de 2013.
Au/Cr	Vidre	Presenta bons resultats. És la combinació amb què es realitzen els experiments que es presentaran posteriorment. Maig del 2013.
Pt/Ti	Vidre	Presenta bons resultats, però comparativament l'or dóna major senyal. Maig del 2013 es dediquen a altres projectes del grup com són proves inicials de detecció d'arsènic.
Pt/Ti	Silici	Presenta bons resultats, però comparativament l'or dóna major senyal. Maig del 2013 es dediquen a altres projectes del grup com són proves inicials de detecció d'arsènic.
Pt/Ti	COP	Presenta bons resultats, però comparativament l'or dóna major senyal. Se solucionen els problemes d'adhesió precedents. Maig del 2013 es dediquen a altres usos.

Taula 4.1. Tipus i resultats obtinguts amb els diferents elèctrodes provats.

És especialment rellevant en aquest sentit el potencial amb què s'inicia la reducció de l'hidrogen, ja que en pH àcids es dóna a valors molt pròxims als de l'oxigen i és present a la mescla. Aquests aspectes es detallaran amb major profunditat a l'apartat de validació de les mesures (Punt 4.4.2). En qualsevol cas, amb les proves prèvies s'ha observat que en les nostres condicions tenien en general un millor comportament els elèctrodes d'or, ja que els elèctrodes de platí presenten un major efecte d'interacció amb els protons.

A la taula 4.1 es presenta els tipus d'elèctrodes testats i les principals conclusions.

Com s'observa a la taula anterior (4.1), després de les proves preliminars es decideix fer una bateria de 4 combinacions diferents de material de l'elèctrode i material de suport, per tal de fer proves comparables, amb les mateixes condicions, i decidir la combinació més adequada per als nostres objectius. En aquest cas, l'elèctrode d'or, sobre suport de vidre i usant el crom com a material d'unió entre els dos.



Figura 4.5. Fotos elèctrodes d'or (nous, abans d'usar). Vista elèctrodes (objectiu x5).



Figura 4.6. Detall (objectiu  $\times 10$ ) d'un connector elèctric i de la unió a un elèctrode. El pixelat que es pot observar és degut a la qualitat d'impressió del fotolit amb el qual es van fer i no al procés de fabricació.

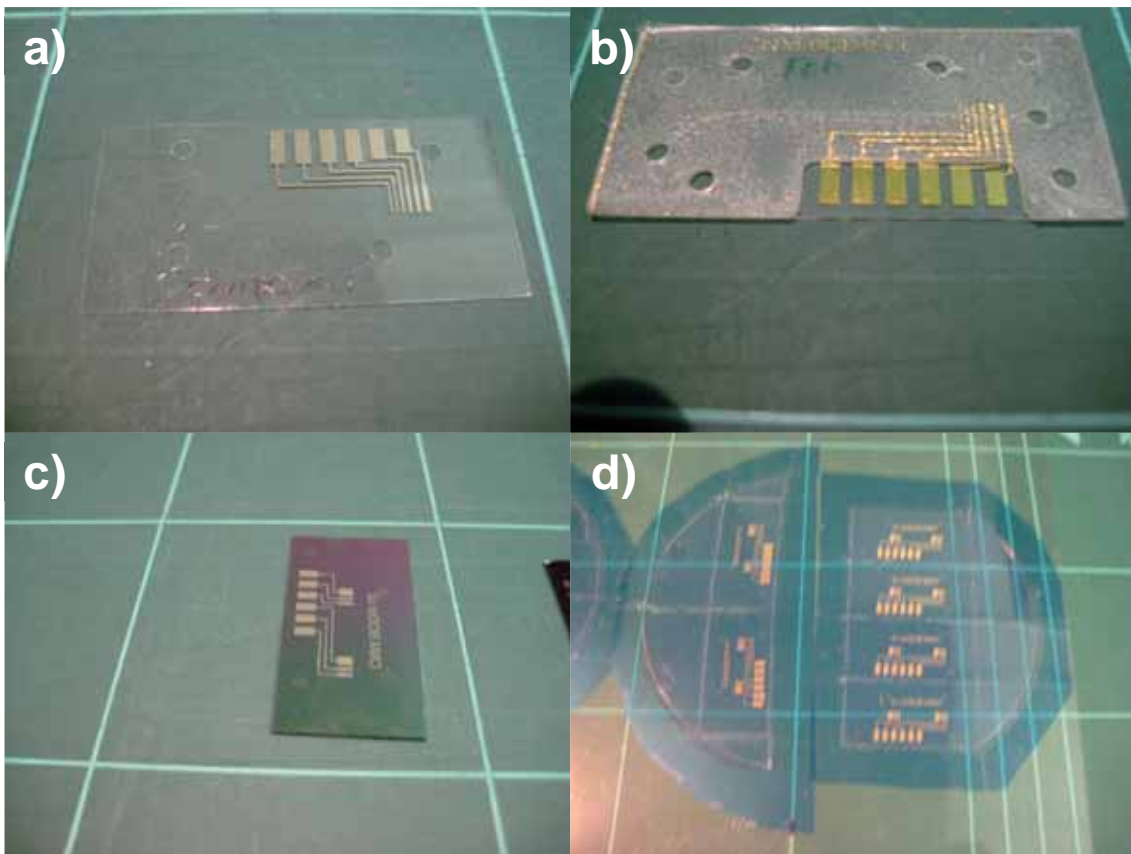


Figura 4.7: Diferents tipus d'elèctrodes fabricats. a) Elèctrodes d'or sobre COP. b) Elèctrodes d'or sobre COP amb el canal de l'electròlit i una membrana de silicó de 50 micres. c) Elèctrodes de platí sobre silici. d) Diferents conjunts d'elèctrodes d'or sobre vidre, tallats sobre l'oblia.

També són rellevants els temps indicats al quadre, ja que com es pot observar, el temps transcorregut entre un procés de fabricació i el següent és de 4 mesos com a mínim. Aquestes limitacions en els temps entre encàrrec i disponibilitat dels dispositius, durant els quals no es poden dur a terme experiments, no es donen amb les tècniques de prototipatge ràpid, com s'ha comentat en la introducció.



#### 4.2.2. PROTOTIPATGE RÀPID

Les tècniques de prototipatge ràpid no responen a una sola categoria, sinó que són diferents tècniques de fabricació que es poden utilitzar per fabricar tot o part d'un microdispositiu.

Si bé en general tenen uns nivells de precisió menors a les tècniques de microfabricació en sala blanca, no deixen de ser adequades per a molts aspectes dels dispositius que no tenen requeriments tan estrictes. Això, afegit al fet que el dissenyador pot dur a terme la fabricació en un termini de poques hores, i amb el control directe de tot el procés, reverteix en un estalvi de temps i econòmic molt significatiu (del Campo 2014). Sigui com sigui, són eines que en general treballen amb precisions d'escala micromètrica, amb límits de precisió que poden estar entre les 10 i 100 micres, segons la tècnica.

És per això que darrerament hi ha hagut un creixent interès i increment d'ús d'aquestes tècniques (Li et al. 2012; Stone et al. 2004; del Campo 2014), que es dona tant en les tècniques utilitzades com en els processos de fabricació i els elements elaborats amb aquestes tècniques.

En el cas del dispositiu s'han utilitzat bàsicament dues tècniques de prototipatge ràpid i se n'han fet proves o valorat la viabilitat amb dues més, que són:

##### TALL DE MEMBRANES:

Plòter de tall: és essencialment una màquina igual que una impressora de gran format o plòter, en el que el capçal d'injecció de tinta és substituït per un suport que incorpora un full de tall de precisió. Així, ajustant la pressió que exerceix el capçal sobre la superfície a tallar i la velocitat d'avanç, es pot ajustar per tallar diferents composicions i gruixos de material a mesura que el capçal es desplaça seguint una ruta determinada mitjançant un document de dibuix o format CAD.

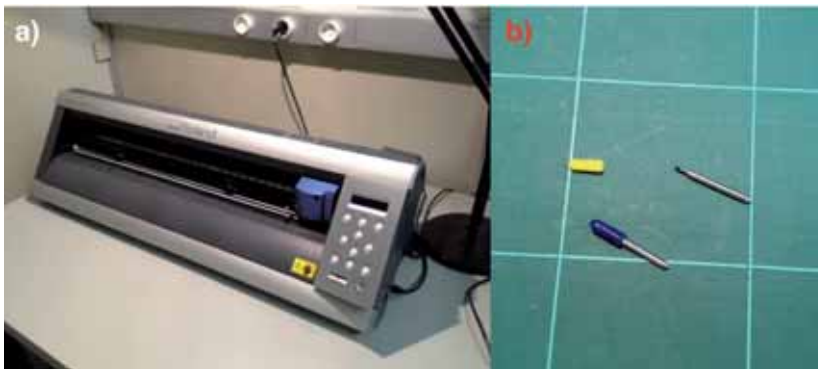


Figura 4.8: Plòter de tall. Una eina cada cop més utilitzada per a processos de prototipatge ràpid és el plòter de tall. Es basa en un plòter estàndard, modificat per tal d'instal·lar una eina de tall a on normalment es troba el capçal d'impressió. Aquesta eina de tall té també un mecanisme de control de la pressió exercida per adaptar el tall a diferents velocitats i gruixos de les làmines a tallar. El sentit i la velocitat del tall es determinen via ordinador i seran rellevants per obtenir talls de màxima qualitat.

La màquina utilitzada és (Roland GX-24 CAMM1) i s'ha fet servir per realitzar diferents elements del prototip, com són:

- Membranes de separació, principalment el tall perimetral i els forats d'alineació amb la resta del dispositiu.
- Membranes amb una i dues cares adhesives per a la construcció dels canals microfluídics, que es fan tallant els canals i punts de pas de l'aigua a la membrana, fet

que ens dóna estructures en dues dimensions, i la tercera l'assolim jugant amb el gruix de la membrana utilitzada.

- c) Tapes del dispositiu, fetes de COP i impermeables al pas d'oxigen.

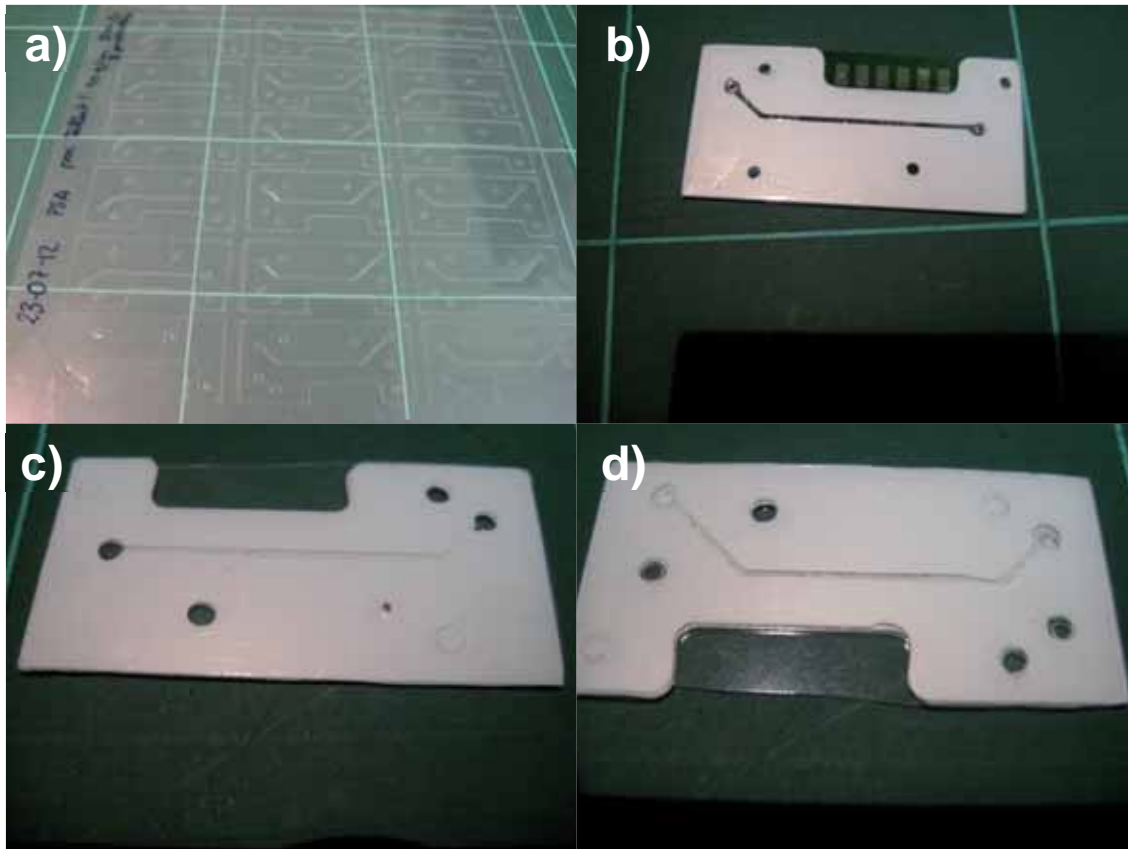


Figura 4.9: a) membranes de PSA tallades amb ploter dels canals de l'electròlit (esquerra) i de la cambra de reacció (centre i dreta). b) Xip muntat amb elèctrodes d'or sobre COP, canal de l'electròlit de PSA i tapes de COP. Xip sense elèctrodes (per a proves hidrodinàmiques) de Cop amb els canals i membrana de separació: c) canal de l'electròlit i d) Canal de la cambra de reacció. Dos orificis excèntrics serveixen per fer l'alineació amb agulles (pins).

Màquina de tall làser: essencialment funciona com el plòter de tall, però l'element que talla és un feix làser de potència ajustable. Aquesta eina presenta dues característiques molt interessants respecte al plòter de tall, ja que, d'una banda, no hi ha contacte directe entre l'element de tall (el làser) i el material a tallar, fet que fa que no hi hagi tensions entre el material i la fulla de tall (sobretot en canvis de direcció) i, de l'altra banda, el feix làser té una dimensió que, depenent de la longitud d'ona utilitzada, oscil·larà entre les 75 i 125 micres, a la qual s'ha d'afegir la línia de tall efectiva, que dependrà del material, i pot ser fins i tot més gran, a l'entorn de les 200 micres, de manera que s'obté una resolució i precisió similars a les del plòter de tall.

Els principals avantatges de treballar amb làser són una major velocitat de tall, la possibilitat de treballar amb materials de diversos gruixos simultàniament i el fet que no hi ha un contacte mecànic entre el material a tallar i l'eina, fet que redueix els estressos al material durant el tall.



Figura 4.10: Màquina de tall làser.

Aquesta màquina no es va utilitzar en aquest projecte tant perquè no en vam poder disposar fins molt al final del mateix, com per l'aprenentatge que requeria per establir les condicions de tall adequades (la calor del feix provoca irregularitats en les superfícies tallades si no està molt ben ajustat

#### FABRICACIÓ DE LA CARCASSA

Per a la fabricació de la carcassa s'han utilitzat diferents fresadores de control numèric.

La major part de les carcasses s'han fabricat amb una fresadora (Roland MXD-40A, precisió  $\pm 10$  micres). Aquesta és una fresadora de quatre eixos que permet fer dissenys tridimensionals complexos. Els eixos de treball són x i y per on es mou el capçal en el pla horitzontal, z, que determina la profunditat a la qual treballa l'extrem de la fresa i un eix r que determina la rotació del suport on s'emplaça la peça.

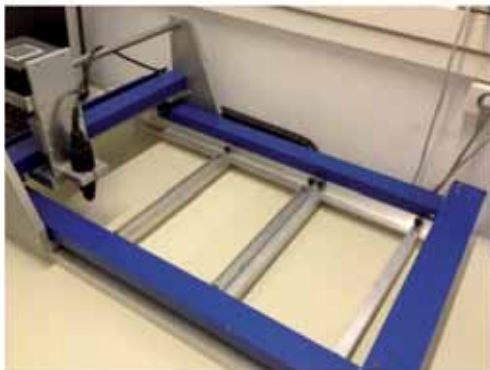


Figura 4.11: Fresadora de tres eixos (2D). Aquest equip va ser utilitzat en els primers prototips de la carcassa. Mitjançant un document CAD es defineix la geometria a treballar i es donen cotes per a la profunditat de tall. La menor precisió i el fet de poder treballar amb elements tridimensionals va fer que es deixés d'utilitzar per utilitzar la fresadora de 4 eixos.

Tot i la possibilitat de treballar amb models tridimensionals, s'ha procurat que els elements prefabricats es poguessin fer sense el requeriment de l'eix rotacional, perquè es donen menys vibracions durant el fresat i això permet incrementar la precisió. Igualment, l'elecció del capçal de fresat i de les rutes de treball establertes seran determinants per la qualitat i precisió final de la peça obtinguda.

Com en el cas de la màquina de tall per làser, també per a la construcció de la carcassa s'han avaluat altres processos de prototipatge ràpid, però que no s'han arribat a posar en pràctica; en part perquè no se'n va poder disposar fins molt al final del projecte i requereixen bastant temps de formació i adaptació, i en part per aspectes de cost.

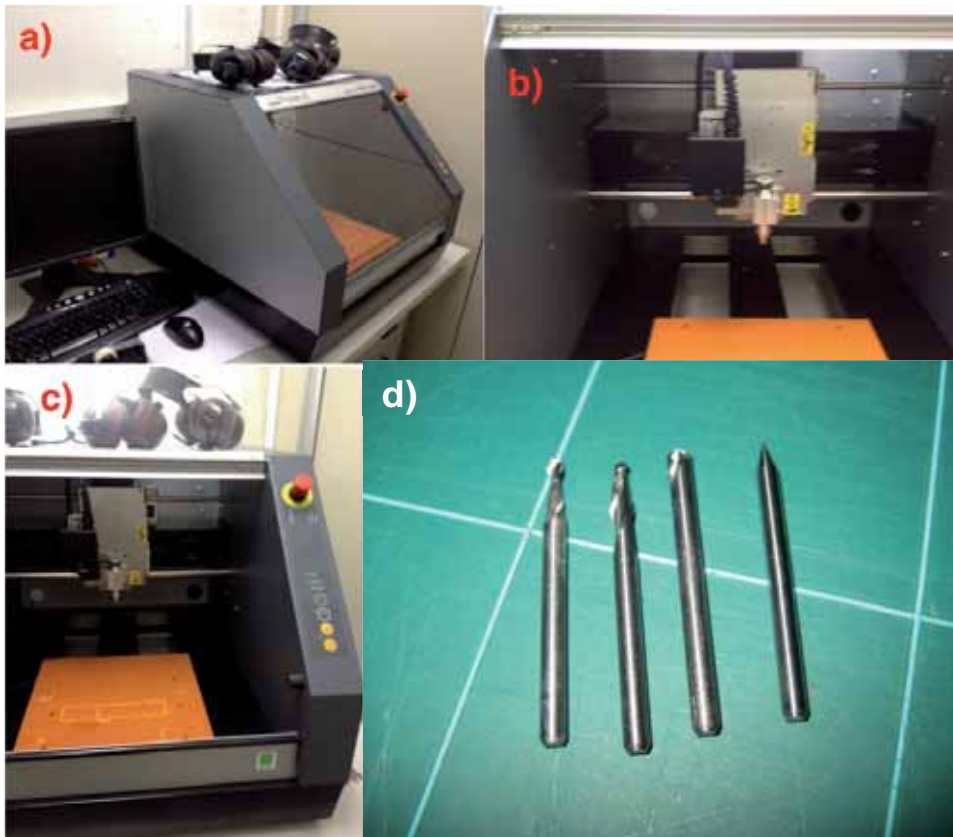


Figura 4.12: Fresadora de 4 eixos. a) Vista general de la fresadora i l'ordinador de control. b) Vista frontal del capçal de treball: aquest es mou en els eixos X i Z, i porta l'eina de treball escollida. c) Capçal i base: la base es desplaça en l'eix Y, de manera que dona els tres eixos bàsics de treball; aquesta base es pot substituir per un braç amb gir (4t eix) que permet realitzar feines de tornejat. Aquesta opció es va descartar, ja que la flexibilitat del material a treballar provocava vibracions i defectes. d) Diferents capçals de treball; d'esquerra a dreta: punta plana, punta rodona, viselat de 30° i punta plana de 20 micres. En funció de la forma del capçal, seran més adequats per a diferents treballs. Això és considerat i controlat pel programari amb el qual s'estableix la rutina de treball.



Figura 4.13: a) diferents tipus de capçals de fresa per adaptar-los a la feina a realitzar. b) agulles d'alineament de diferents gruixos i longituds.

#### 4.2.3. MATERIALS MEMBRANES DE SEPARACIÓ

Aquest és potser l'element més rellevant del dispositiu proposat, i el que presenta majors restriccions en les seves característiques. És l'aspecte més diferenciador respecte als altres

sistemes de mesura ràpida de la DBO o altres sistemes electroquímics equivalents, tant disponibles en el mercat com en fase d'estudi científic (Anon 2010; Anon 2002; Process 2011). Les principals diferències que presenten respecte a la majoria de sensors habituals són:

Pas molt específic de l'oxigen en forma gas, en part per les propietats hidrofòbiques de la silicona, que evita el pas d'altres elements disfuncionals per al sistema, com compostos orgànics o altres compostos variables i no predeterminats.

Això va estretament vinculat a reduir els requeriments de pretractament de la mostra, el qual és un punt molt rellevant per no alterar-ne significativament la composició i obtenir uns resultats el més comparables possibles a la mesura estàndard de la DBO<sub>5</sub>.

L'increment de l'àrea de secció transversal que representa separar els dos canals amb una membrana, respecte a protegir exclusivament la superfície de l'elèctrode, que ha de permetre el pas d'una major quantitat d'oxigen en el conjunt del dispositiu, alhora que permet majors concentracions d'oxigen a la superfície de l'elèctrode, augmentarà la sensibilitat del dispositiu.

En principi, tant per les característiques del material, com pels resultats de les simulacions prèvies, un bon material per assolir els objectius buscats seria una membrana hidrofòbica i permeable a gasos, com per exemple una de silicona del menor gruix possible; tot i això, durant la fase de validació s'han trobat diferents problemes en l'ús de les membranes de silicona més primes disponibles, sobretot a causa de la davallada en la resistència estructural que implica reduir-ne el gruix.

El requeriment de resistència estructural no és només en el sentit de garantir que no es malmeti la membrana, per trencaments o obertures, sinó que també és important per tal de mantenir estables els volums tant del canal de l'electròlit com, sobretot, de la cambra de reacció, ja que aquest és un factor determinant per conèixer el volum de mostra de l'experiment i, per tant, per relacionar els resultats de les proves electroquímiques amb valors estandarditzables.

Aquests problemes estructurals s'han pogut resoldre parcialment amb l'ús de membranes més gruixudes del mateix material, però amb la consegüent minva en la difusibilitat d'oxigen que ja es preveia en els models informàtics.

Alternativament s'han provat experimentalment altres tipus de membranes que poguessin aconseguir els requeriments de disseny, amb resultats diversos.

A l'apartat 4.4.4 es comenten més extensament tant els tipus de membranes assajats com els resultats obtinguts amb cadascuna d'elles.

#### SISTEMA MICRO-FLUÍDIC

Com s'ha comentat a l'inici de l'apartat, els canals microfluídics s'han confeccionat mitjançant l'ús de membranes de diferents gruixos (que determinen l'alçada dels canals) a les quals s'ha tallat les conduccions fluídiques mitjançant un plòter de tall.

Les capes de material utilitzades, en el nostre cas de PSA (*Pressure Sensitive Adhesive*), tenen un gruix altament homogeni de 130 micres, que és sensiblement superior al considerat amb els models numèrics. Mitjançant la combinació de membranes amb una i dues cares adhesives i un bon sistema d'alineació, sobreposant-les ens permet unir les membranes de separació, els diferents nivells de les membranes de canals fluídics i tot el conjunt tant amb el suport dels elèctrodes com amb la tapa superior de COP (vegeu detall).

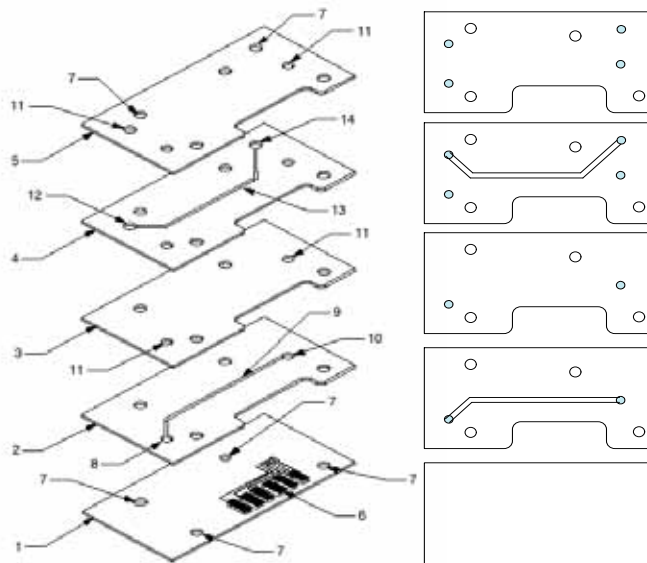


Figura 4.14: a) Esquema membranes del sensor de DBO en perspectiva. b) Planta de les membranes.

- 1) Suport de vidre que inclou els elèctrodes d'or gravats per litografia i els punts d'alineació (7).
- 2) Membrana de doble cara adhesiva tipus AR92812 amb el canal d'electròlit (9) i orificis pel pas d'aigua (8 i 10) i alineació (7).
- 3) Membrana de difusió d'oxigen amb orificis de pas d'aigua (11) i alineació (7) tallats.
- 4) Membrana de doble cara adhesiva tipus AR92812 amb el canal de la mostra (13) i orificis per al pas d'aigua (11) i alineació (7).
- 5) Membrana superior de tancament tipus Zeonor que inclou els punts d'alineació (7) i els orificis de pas d'aigua (11).
- 6) Elèctrodes gravats sobre vidre de crom (20 nm Cr) i or (100 nm Au), circuits elèctrics i àrees de connexió elèctrica al connector.
- 7) Punts d'alineació (a totes les capes).
- 8) Entrada de l'electròlit.
- 9) Canal de l'electròlit, en contacte amb els elèctrodes.
- 10) Sortida de l'electròlit.
- 11) Orificis passants per al transport de l'aigua a diferents capes.
- 12) Punt d'entrada de la mostra.
- 13) Canal de la mostra o cambra de reacció. 50 o 100 micres d'amplada i 130 micres d'alçada.
- 14) Punt de sortida de la mostra.

Aquesta opció, permet una fabricació ràpida a baix cost i molt versàtil, que pot ser utilitzada per a molts altres sistemes microfluídics, com es descriu a l'apartat d'annexos 7.2. Permet fer canals amb fins i tot millor detall i precisió que tècniques alternatives com els motllos de silicó o similars, i de manera més ràpida i econòmica.

#### 4.2.4. CARCASA

La carcassa és l'estructura que permet integrar i connectar els diferents elements que componen el sistema. Està feta de material plàstic transparent, inert, rígid i resistent.

Segons la versió de carcassa (*holder*, en anglès) s'ha fabricat indistintament amb metacrilat o policarbonat. Així, partint de peces d'un gruix de 10 mm, s'han mecanitzat amb la fresadora computeritzada fins a assolir les dimensions de disseny.

Les funcions que ha d'acomplir la carcassa són:

- a) Encaixar el xip de forma precisa per fixar-lo i permetre les connexions elèctriques i hidràuliques.
- b) Servir de suport per connectar les connexions hidràuliques (aquestes s'han fet amb diferents sistemes, com són connectors comercials roscats, mitjançant l'ús de *luers* o

- connectors a pressió de materials plàstics semiflexibles o connectant agulles hipodèrmiques adaptades i fixades amb adhesius).
- c) Fixar connectors elèctrics estàndards, per poder connectar el sensor al potenciòstat extern amb el qual es fa la mesura.
  - d) Servir de guia d'alineament per tal de construir el xip (compost pel suport dels elèctrodes, membranes dels canals, membranes de pas d'oxigen i tapes) amb la màxima precisió.
  - e) Disposar d'un sistema de tancament de pressió uniforme i ajustable finament per a tota la superfície i vores (mitjançant cargols roscats).
  - f) Garantir l'estanqueïtat hidràulica de totes les connexions i, en la mesura del possible, l'estanqueïtat a gasos a la zona del xip.

Al llarg del desenvolupament del dispositiu s'han anat fent modificacions al disseny de la carcassa per anar-hi incloent adaptacions i millores pràctiques; se n'han fet més de 5 prototips. En aquests dissenys s'han provat diversos sistemes de fabricació de les connexions hidràuliques, el tipus i mètode per inserir el connector elèctric, el sistema d'alineació de les diferents capes del xip i l'encaix del xip a la carcassa o l'adaptació a l'ús de diferents tipus de juntes estanques com les tòriques o les autofabricades de PSA i silicona.

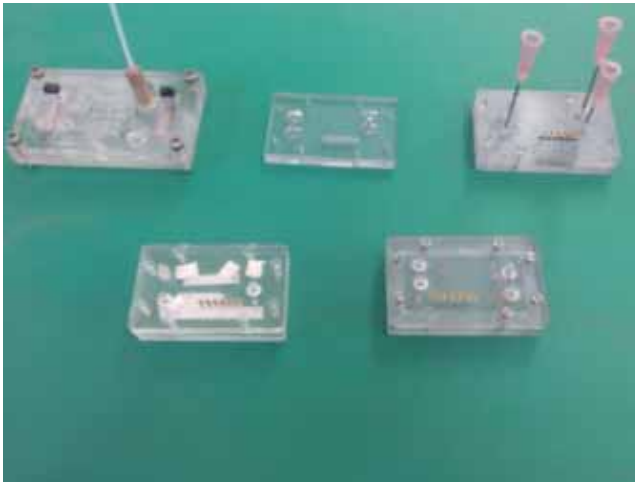


Figura 4.15: Diferents prototips fabricats de la carcassa (Numerar-les i posar alguna característica rellevant, potser).



Figura 4.16: Un dels primers prototips amb connexions hidràuliques roscades, placa interior i connector elèctric comercial estàndard.

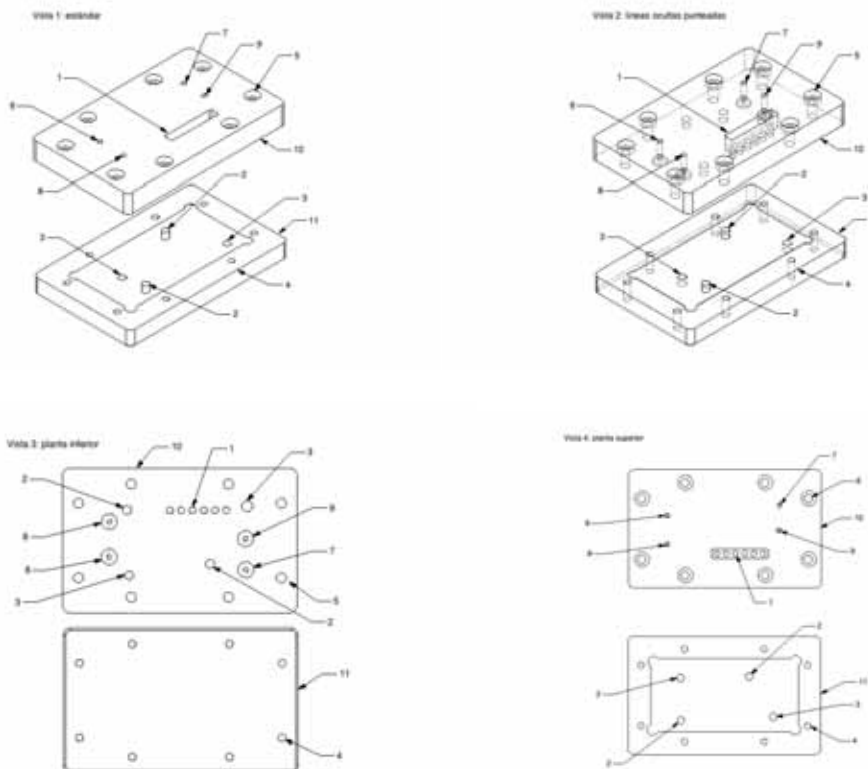


Figura 4.17: Vista en perspectiva de la carcassa definitiva. 1) Encaix per al connector elèctric estàndard i els pins de connexió (x6). 2) Orificis per a la col·locació dels pins d'alineament positius. 3) Orificis per a la col·locació dels pins d'alineament negatius. 4) Orificis roscats per tancament amb pressió controlada (8 en total). 5) Orificis folgats per pas dels cargols. 6) Entrada de la mostra. 7) Sortida de la mostra. 8) Entrada del canal de l'electròlit. 9) Sortida del canal de l'electròlit. 10) Part superior de la carcassa. 11) Part inferior de la carcassa.





Figura 4.18: Vista de la carcassa muntada. Detall de les juntes de silicona a les connexions fluídiques i de les juntes perimetrals de silicona per evitar el pas d'oxigen. Les unions hidràuliques són per connectors (*luers*) comercials de (MATERIAL). Els connectors elèctrics s'emporten individualment i a l'interior s'hi pot observar el caixetí d'encaix del xip, fet per un rebaix de 100 micres.

#### JUNTES ESTANQUES

Tot i que aquestes juntes són independents de la carcassa, les comentem breument.

S'han utilitzat juntes per garantir l'estanqueïtat de les connexions hidràuliques. Inicialment es van fer amb juntes tòriques (o toroidals) comercials. Però el seu perfil circular portava problemes estructurals ja que la concentració de la força en una reduïda superfície, incrementant la pressió, comportava o bé l'estrangulament dels canals fluídics (fabricats amb capes de membranes flexibles) o bé, fins i tot, el trencament dels xips fabricats amb suport rígid (vidre i silici).

Per resoldre aquest problema, s'han fabricat juntes una capa de silicona i una altra capa de PSA amb adhesiu a les dues cares. Un cop obtingut el full compost, es tallen les juntes mitjançant el plòter de tall.

Amb aquesta millora s'han resolt tant els problemes de trencament dels suports com els estrangulaments dels canals fluídics (vegeu punt 4.4).

D'altra banda, durant la validació experimental s'ha detectat l'entrada d'oxigen extern al sistema. Per limitar aquesta entrada s'han adoptat diferents mesures, una de les quals és la fabricació de membranes perimetrals de silicona que es col·loquen humitejades entre les parts superior i inferior de la carcassa, per limitar el pas de gasos.

Aquestes juntes perimetrals s'han fabricat amb fulls de silicona de diferents gruixos per tal que, apilant-los, s'obtingui el gruix desitjat, en funció del xip a testar.

#### 4.2.5. ALINEAMENT

En treballar amb un sistema que inclou un xip format per quatre capes flexibles i una de rígida (vegeu figura 4.14), que inclouen connexions hidràuliques entre elles, ha calgut desenvolupar un sistema que permetés un alineament el més precís possible entre elles.

Per tal de fer aquest alineament, s'han realitzat forats d'alineament a totes les capes flexibles del xip, amb un diàmetre d'1,5 mm. Aquests forats estan alineats ja amb els models de CAD de manera que es controla el plòter de tall i surten, per tant, als mateixos punts en els eixos x i y de cadascuna de les tapes.

El *holder* o carcassa inclou també orificis d'1,55 mm on s'encaixen pins d'alineament d'1,5 mm (deixant un marge d'error inferior a les 50 micres). Així, la mateixa carcassa serveix de guia per l'alineació de les capes flexibles que s'uneixen consecutivament mitjançant l'adhesiu que algunes d'elles incorporen.

Un cop unides les capes entre elles (i, per tant, els sistemes fluídics, la membrana de separació i la tapa) es mantenen a lloc, a la meitat superior de la carcassa, mitjançant els mateixos pins d'alineament, i es col·loca la base, que inclou els elèctrodes, a un encaix de 100 micres de profunditat i 20,05 x 40,05 mm realitzat a la part inferior de la carcassa. Ambdues meitats se centren mitjançant els 8 cargols de tancament de la carcassa i en cargolar-los s'uneixen el conjunt de membranes i la base rígida, que igualment s'uneixen per l'adhesiu incorporat a la primera.

Aquesta darrera unió no té tanta precisió com les unions entre capes flexibles (que té un error a l'entorn de 50 micres), però no és tampoc tan restrictiva, ja que els elèctrodes s'han dissenyat d'una major longitud del necessari per poder-s'hi adaptar.

### 4.3. MUNTATGE EXPERIMENTAL

Amb el muntatge experimental, ens referim a com s'ha procedit al laboratori per a la realització de les proves de validació dels diferents elements i el dispositiu.

Un dels aspectes que s'ha anat variant del disseny inicial, per adaptar-lo als resultats de les proves inicials, ha estat l'ús i configuració dels diferents elèctrodes.

Així, si bé inicialment es va preveure incloure el *set* de tres elèctrodes necessaris per a les proves en el mateix xip, fins i tot per duplicat per poder testar la concentració d'oxigen a l'inici i al final del canal del dispositiu, diverses consideracions han fet anar variant aquest disseny inicial.

D'una banda, no s'ha utilitzat el *set* d'elèctrodes emplaçat a l'inici del canal, ja que s'ha optat per garantir que l'electròlit entrant estigui a saturació d'oxigen i, per tant, el feia una mesura no tan rellevant. Per altra banda, l'interès de poder fer mesures simultànies a dos punts del canal implicava l'ús en paral·lel de dos potenciòstats i, com s'ha explicat a l'apartat (apartat 4.4.2) corresponent, podíem esperar interaccions no desitjades entre els dos punts de mesura.

Respecte al *set* d'elèctrodes emplaçat al final del canal de l'electròlit, si bé es van fer les primeres proves utilitzant tots tres elèctrodes, es van detectar diferents problemes d'interaccions entre ells i es van provar configuracions alternatives. Per a l'elèctrode de treball sempre s'ha utilitzat l'imprès al suport. A la taula 4.2 es comenten breument les diferents configuracions i els resultats obtinguts.

Elèctrode	Posició	Observacions
Auxiliar	Intern (1)	Problemes d'interacció amb els elèctrodes de treball i contra-elèctrode.
Auxiliar	Fil de Pt A sortida	Bons resultats. S'insereix un fil de platí de 300 micres de diàmetre al tub de sortida per succió fins a l'interior de la carcassa.
Referència	Intern (1)	Problemes d'interacció amb els elèctrodes de treball i referència
Referència (2)	Extern Fil pla -tinitzat	No presenta problemes d'interacció amb l'elèctrode de treball, però sí que incrementa el soroll del senyal, perquè no està aïllat del medi.
Referència (2)	Extern comercial	Bons resultats. Millora els problemes de soroll del fil platinitzat. És el que s'utilitza en les anàlisis.

Taula 4.2. Configuracions dels elèctrodes. (1) *Intern* fa referència a utilitzar els elèctrodes litografiats al suport inicialment previst. (2) En ambdós casos s'han emplaçat al dipòsit previ de l'electròlit, on hi ha un major volum i, per tant, hi ha homogeneïtat.

Respecte al muntatge dels diferents elements necessaris per fer les proves, inclou:

- La carcassa muntada, incloent el xip.
- Una bomba de xeringa que treballa a succió per obtenir els cabals desitjats per l'experiment i poder controlar la concentració d'oxigen en la dissolució que passa pel sistema.
- El potenciòstat, amb el qual es realitzen les diferents proves electroquímiques.
- El dipòsit de l'electròlit, on es fan les barreges de gasos per canviar-ne les condicions. En el mateix dipòsit, també s'hi emplaça l'elèctrode comercial de referència.

- e) Un sistema de control de gasos (aire filtrat i nitrogen pur) per controlar el nivell de concentració d'oxigen al dipòsit de l'electròlit.
- f) La introducció de nitrogen als espais lliures de la carcassa per reduir la presència d'oxigen extern al sistema.

Als següents esquemes s'hi detallen gràficament aquests elements i la seva col·locació:

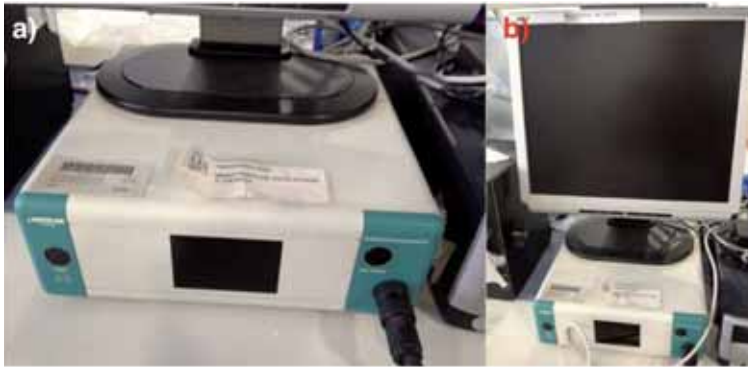


Figura 4.19: Potenciòstat de marca microAutoLab, amb el qual s'han fet les mesures.

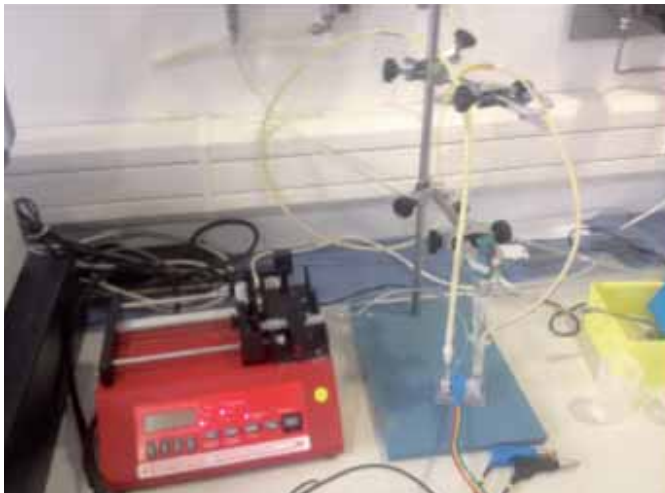


Figura 4.21: Detall de la carcassa i les connexions. A la part inferior s'observa el connector elèctric dels 6 elèctrodes. A la dreta de la carcassa hi ha el dipòsit d'alimentació (construït amb una xeringa) al qual es difon la barreja de gasos per fixar la saturació d'oxigen, així com l'elèctrode extern. A la part esquerra s'observa el microtúbul mitjançant el qual es fa la succió (a l'interior del microtúbul hi ha emplaçat l'elèctrode auxiliar fet amb un fil de platí de 300 micres de diàmetre). També s'observa el tub (blanc, de silicona i més gruix) amb el qual s'introdueix nitrogen als espais buits de la carcassa per evitar l'entrada d'oxigen.

Figura 4.20: Muntatge general. A l'esquerra s'observa la bomba de xeringa de 2 canals amb què es defineix la velocitat de flux (s'han fet proves tant en succió com en perfusió). A la part baixa s'observa el dispositiu amb els connectors elèctrics i al darrera, la columna que subjecta un altre equipament accessori (vegeu el detall en figures posteriors).

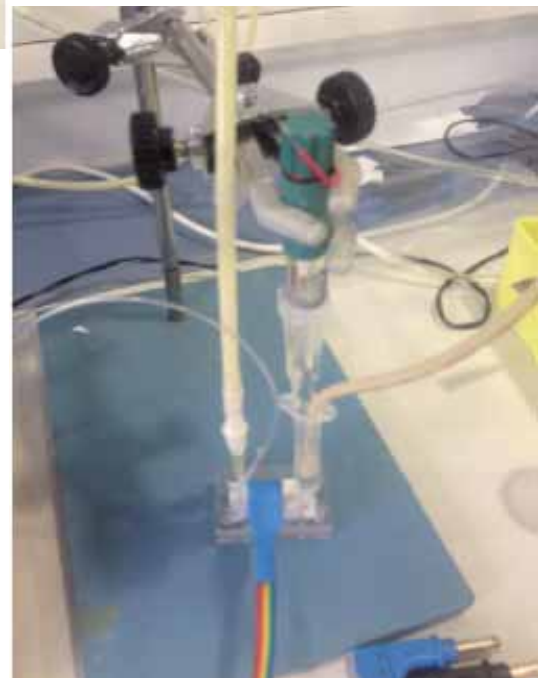




Figura 4.22: Sistema de control de gasos. El percentatge de saturació d'oxigen es controla mitjançant la barreja d'aire i nitrogen pur (mitjançant el cabal bombejat en ml/min). Així, ajustant els manòmetres corresponents, s'obtenen riqueses d'aire (amb l'oxigen corresponent) de 100, 66, 50, 33 i 0 per cent.

## 4.4. VALIDACIÓ DELS PROTOTIPS

### 4.4.1. ELÈCTRODES

El primer element que cal validar són els elèctrodes fabricats, per assegurar-nos que disposem d'un sistema adequat per fer les mesures necessàries.

Al punt 4.2.1, ja s'ha comentat els diferents problemes que hi ha hagut amb la durabilitat i la sensibilitat d'algunes de les combinacions de materials de l'elèctrode i del suport que s'han assajat. Per tant, i en endavant, ens referirem només als resultats obtinguts amb el conjunt que ens ha donat millors resultats previs, és a dir, elèctrodes d'or impresos sobre vidre.

En tots els experiments, l'electròlit que s'ha utilitzat és una dilució de nitrat potàssic ( $\text{KNO}_3$ ) a concentracions d'entre 0,1 i 1 M. Aquesta concentració s'ha considerat suficient per tal d'assegurar que el medi aquós és prou conductor com per evitar que la resistència elèctrica de la dissolució afecti el valor de potencial aplicat a l'elèctrode de treball i, a la vegada, per garantir que els processos de migració elèctrica no són rellevants.

A part de les proves prèvies destinades a conèixer el comportament general dels elèctrodes amb les anàlisis a realitzar, bàsicament voltamperometries cícliques i cronoamperometries, un primer element era conèixer la durabilitat dels elèctrodes en estat funcional.

Si bé a l'inici de cada cicle diari d'anàlisis els elèctrodes s'activaven per recuperar-los de possibles processos de passivació, esporàdicament s'han realitzat proves de calibrat amb un agent redox reversible conegut (ferro-ferrocianur de potassi al 50%), per tal de verificar-ne el funcionament i avaluar la pèrdua d'activitat causada per l'ús.

### 4.4.2. MEMBRANES I CANALS

A continuació es comenten algunes observacions de la qualitat dels talls, canals i elèctrodes a partir de fotografies i microfotografies fetes durant i després de utilitzar el material.



Figura 4.23: Composició de fotos de microscòpia del canal amb elèctrodes d'or: visió general. a) Detall de la sortida del canal. b) Canal després de cert ús. c) Elèctrode després de cert ús. (Vegeu les figures següents per a una explicació més detallada.)

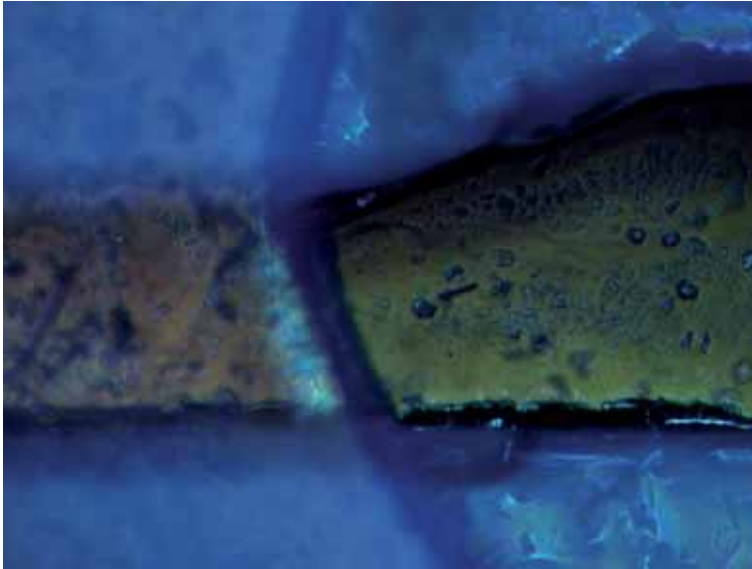


Figura 4.24: Detall a) Sortida d'un canal. La capa superior que creua el canal és la làmina de COP que tanca el dispositiu. S'observa la qualitat del tall amb plòter per a una corba. La capa inferior també és de COP, però adquireix un to grogós per la base del microscopi. La capa de coloració blavosa correspon a la làmina de PSA que defineix la geometria del canal, també tallada amb plòter de tall.

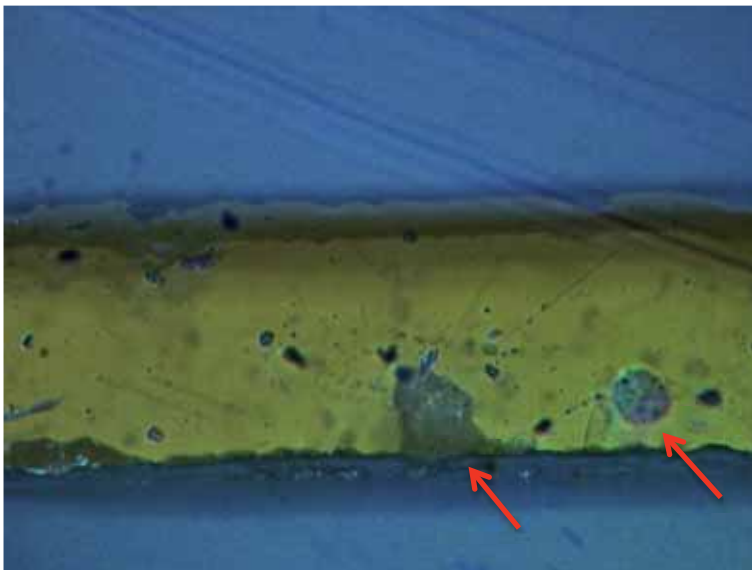


Figura 4.25: Detall b) Secció del canal abans de la zona d'elèctrodes. A la part inferior s'hi observa una protuberància i una intrusió (fletxes): segurament correspon a adhesiu contingut a la làmina de PSA, provocat per un excés de pressió, ja que no s'ha observat en tots els casos analitzats.

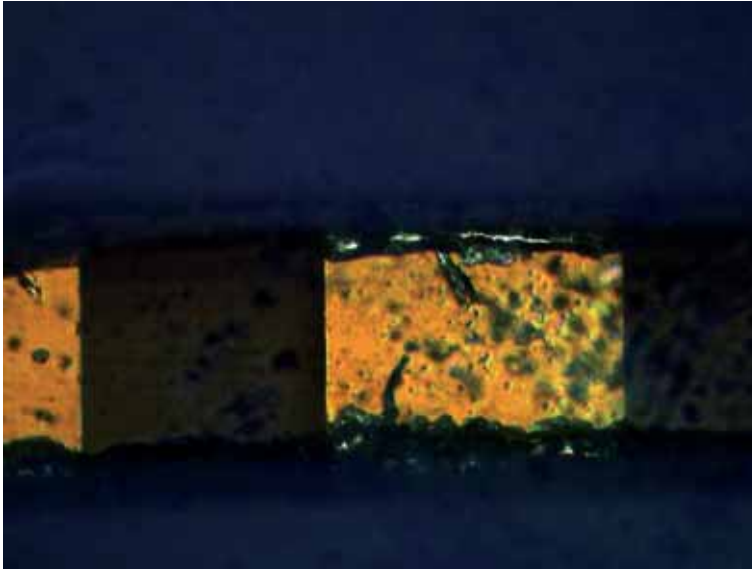


Figura 4.26: Detall c) Elèctrode d'or, després de diversos cicles de treball, on s'observa cert escrostonat de la superfície i, per tant, el crom que s'ha utilitzat com a metall de transició entre el COP i l'or. Els elèctrodes de platí han mostrat una major consistència amb el temps.

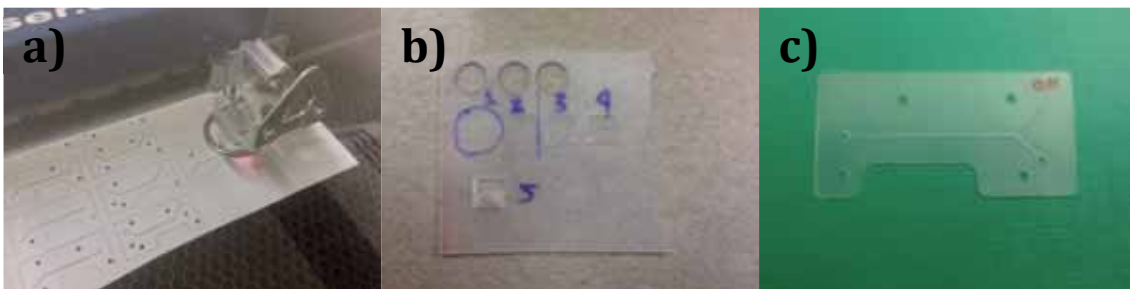


Figura 4.27: Proves amb làser. a) Tall de membranes de PSA amb bona qualitat. b) Proves de tall i rebaixat sobre membrana de silicona: s'observa el perfil cremat als talls circulars superiors, 5 correspon a un rebaix de la membrana sense arribar a perforar-la. c) Tall i rebaix de membrana de silicona. A la figura següent s'observa aquesta membrana al microscopi.



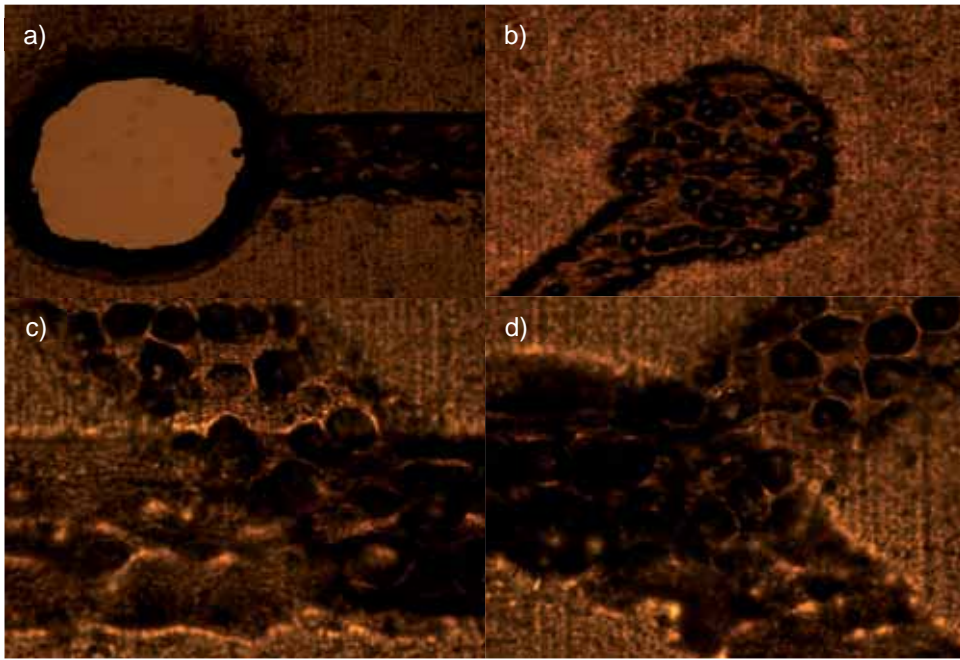
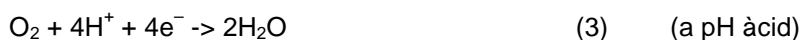


Figura 4.28: Fotos del tall amb làser d'una membrana de silicona (objectiu  $\times 10$ ). Entrades i sortides dels canals fluídics (a i b). Vistes d'intersecció de canals (c i d). Prova feta amb membrana de silicona i treballada per ambdós costats per determinar el gruix de la membrana. Comentaris: Superfície rebaixada irregular i potser restes combustió. No passa l'aigua.

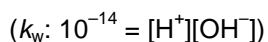
#### 4.4.3. EFECTE DEL PH EN LES MESURES

En el cas de la reducció d'oxigen, ens trobem amb una reacció en dos passos: un primer on l'oxigen gas es protona i dona grups OH, i un segon on aquests grups es protonen al seu torn i formen aigua, com es mostra a la reacció següent:



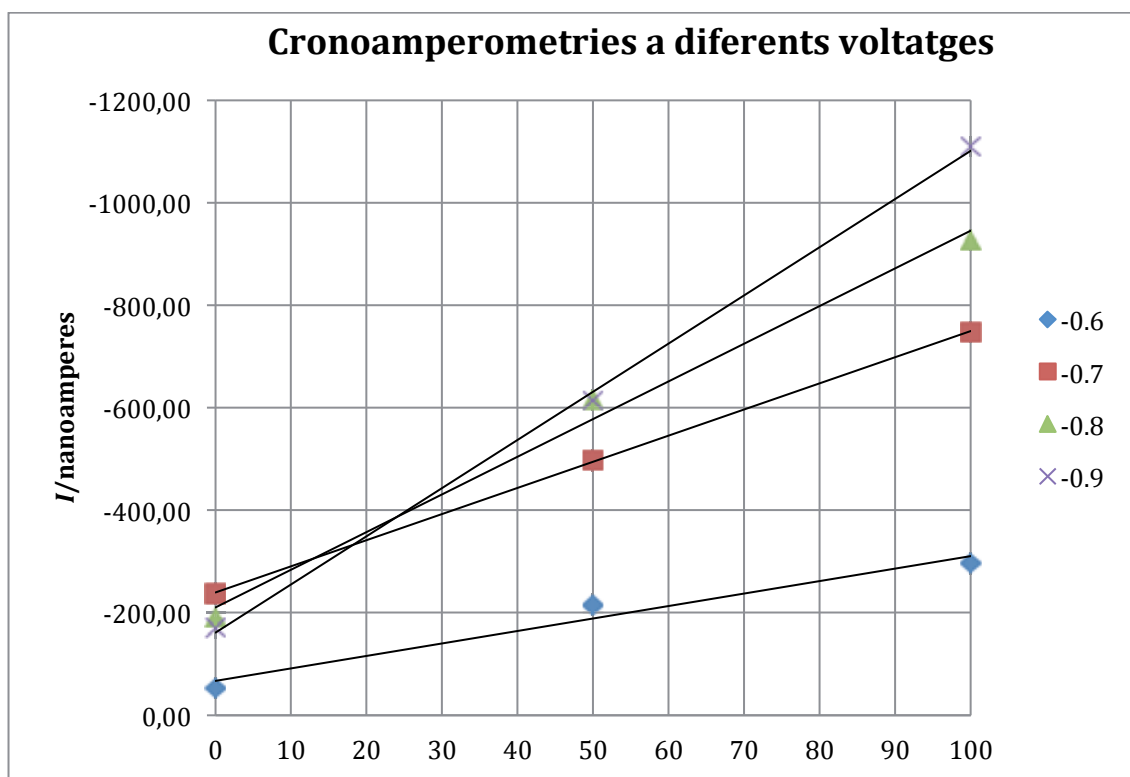
En aquesta reacció hi observem dos aspectes importants. D'una banda, la reducció de cada molècula d'oxigen requereix l'aportació de 8 electrons. Aquest requeriment o consum d'electrons, com que la reacció es dona a la superfície de l'elèctrode, generarà un corrent elèctric, que és en si el que mesura el sensor.

L'altre aspecte rellevant és que, per dur a terme cadascun dels passos de la reacció de reducció, es requereix la presència de protons ( $\text{H}^+$ ), que provindran o bé de la dissociació de l'aigua, sobretot en el primer pas de la reacció de reducció:



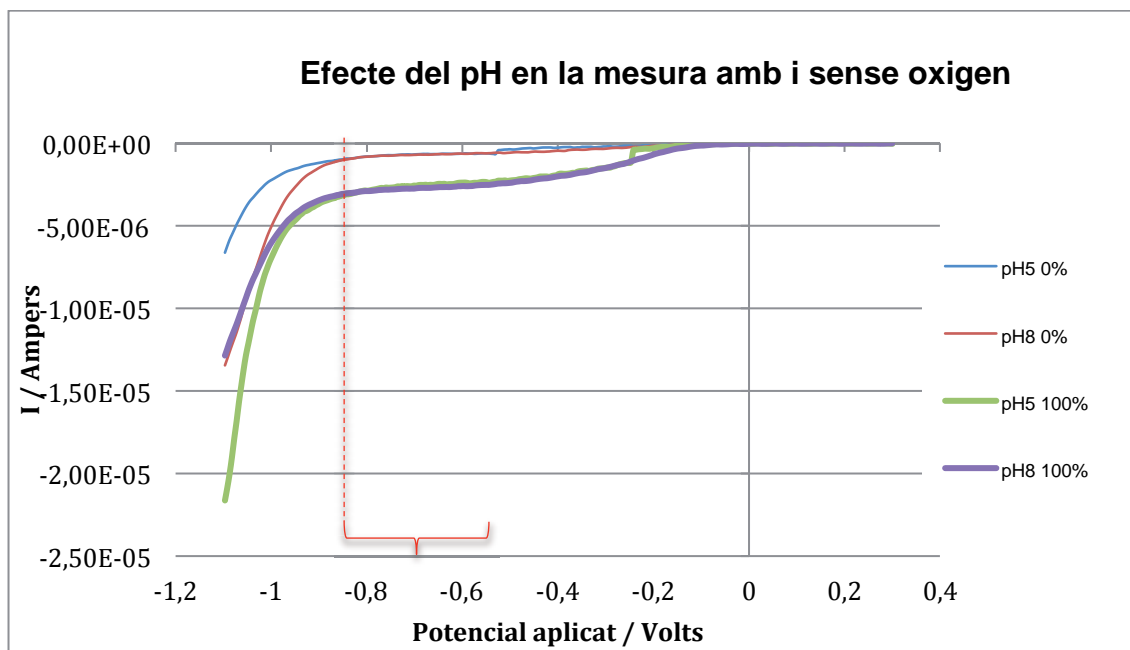
O bé dels protons presents en el medi. És precisament aquest consum de protons presents al medi el que fa que la mesura sigui altament dependent del pH, que en determina l'abundància i, per tant, la facilitat d'obtenció d'aquests protons. Així, tot i que la mesura total en si no variarà significativament, sí que ho farà la dinàmica de la reducció i el voltatge òptim al qual agafar les mesures.

En els experiments de laboratori, treballem amb un medi de pH conegut ( $\text{KNO}_3$  0,5-1M, amb buffer fosfat), amb el qual s'ha avaluat el potencial de mesura, que s'ha establert en un potencial de  $-0,6$  V, punt on es té una pràctica totalitat de l'oxigen reduït, però encara no es donen processos significatius de reducció de l'hidrogen.



Gràfic 4.1: Correlació entre el percentatge de saturació de  $\text{O}_2$  i el senyal obtingut (en nanoamperes), per a diferents voltatges amb  $\text{KNO}_3$

D'altra banda s'ha realitzat un banc de tampons per a un rang de pH que va de 5 a 8 unitats de pH, amb els quals s'ha observat la dinàmica de la reducció d'oxigen a l'elèctrode mitjançant voltametria cíclica per tal de trobar els potencials a aplicar a les cronoamperometries per obtenir valors vàlids.



Gràfic 4.2: Al gràfic s'observa com a pH més bàsics, s'inicia abans els processos de reducció de l'hidrogen, a l'entorn de -0,85 V (línia discontinua). El rang de mesura adequat serà per tant amb potencials d'entre -0,5 i -0,85 V (parèntesis).

#### 4.4.4. PROVES AMB UN CANAL

Tot i que tots els resultats que es presenten a continuació s'han fet amb el xip complet (elèctrodes, canal electròlit, membrana de silicona de 130 micres, cambra de reacció i tapa), inicialment s'ha treballat només amb el canal de l'electròlit per tal de comprovar aspectes com la qualitat fluidica i els senyals obtinguts a diferents concentracions d'oxigen conegudes.

#### FLUÍDICA

Un primer aspecte a validar és que el sistema fluídica dissenyat mitjançant membranes apilades respongui adequadament als diferents cabals de treball necessaris per a l'experiment.

D'una banda, el fet de treballar amb membranes flexibles podia fer que les juntes d'estanqueïtat provoquessin obturacions dels canals si exercien massa pressió sobre les membranes. En aquest sentit, també ha estat important el canvi de juntes tòriques per juntes autofabricades de silicona, que reparteixen millor la pressió.

Per l'altra banda, conèixer si el cabal bombejat teòric (generalment succionat, però també perfusionat segons els casos) es correspon amb el real és important per a l'exactitud de les mesures. S'ha comprovat que és així, recollint volums coneguts en un temps determinat en un recipient final.

També s'ha procedit connectant el sistema de bombeig durant un minut aproximadament abans de fer les mesures, per tal d'evitar cabals alterats per la resistència hidràulica al pas pels canals microfluídics i la formació del perfil de velocitat de fluxos estables. (Cooper & Compton 1998;

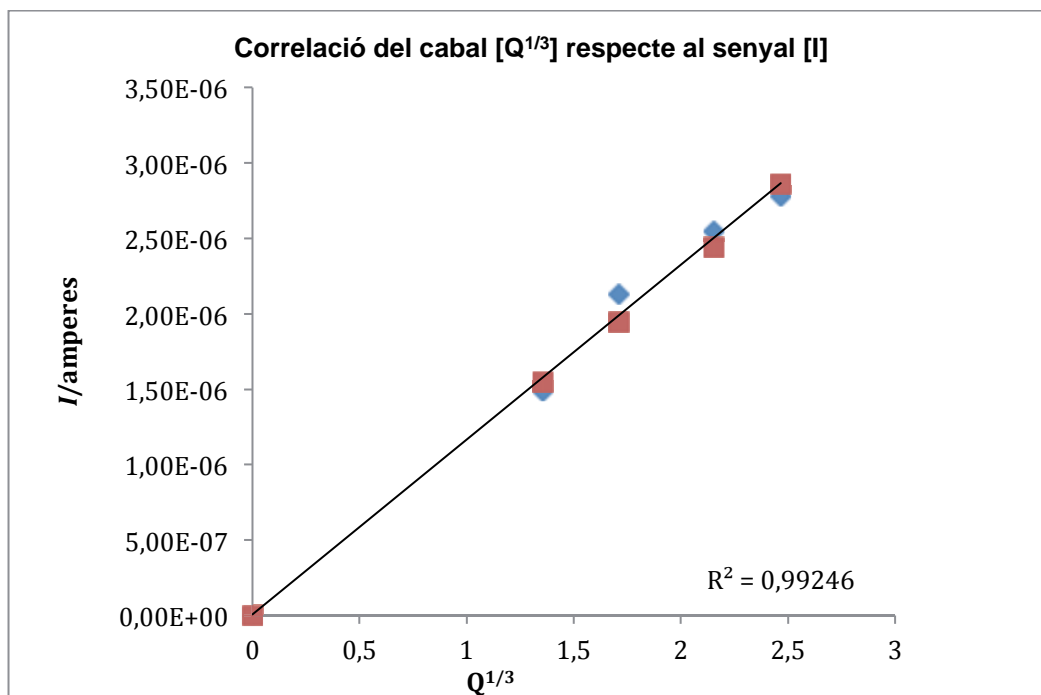


Figura 4.29: Esquema del consum d'oxigen produït per la mesura electroquímica i del perfil de velocitats del fluid en un microcanal.

$$(4.1) \quad I = 0,925 F c_w (x_e D)^{\frac{2}{3}} \left( \frac{4}{3} \frac{v_{\max}}{h} \right)^{\frac{1}{3}}$$

En aquesta funció hi observem que el component del cabal ( $v_{\max}/h$ ) té una relació  $x^{1/3}$  amb el senyal  $I$ . Això ens permet comparar el senyal elèctric obtingut amb el potenciòstat per a l'electròlit saturat d'oxigen per a diferents cabals, com es mostra al gràfic 4.4.

La correlació entre el corrent observat i els diferents cabals es mostra al gràfic 4.4 i presenta una bona correlació,  $R^2$  superior a 0,99, cosa que indica que el sistema respon bé al rang de cabals analitzats.



Gràfic 4.4: Mesura d'oxigen en un canal. Correlació entre l'arrel cúbica del cabal i el senyal obtingut en amperes ( $I$ ). Serie 1 i 2, correspon a dos experiments independents. (Vegeu el text per una explicació completa).

#### RESPOSTA A DIFERENTS CONCENTRACIONS D'OXIGEN

Un cop comprovat que el canal de l'electròlit respon bé als cabals d'anàlisis, s'ha procedit a comprovar la resposta en diferents concentracions d'oxigen conegudes bombejades a través del canal de l'electròlit.

Es procedeix injectant una proporció coneguda d'aire filtrat i nitrogen al reservori d'entrada del dispositiu que es deixa uns minuts (de 3 a 5) en funcionament per tal que l'electròlit adquireixi la concentració d'oxigen desitjada.

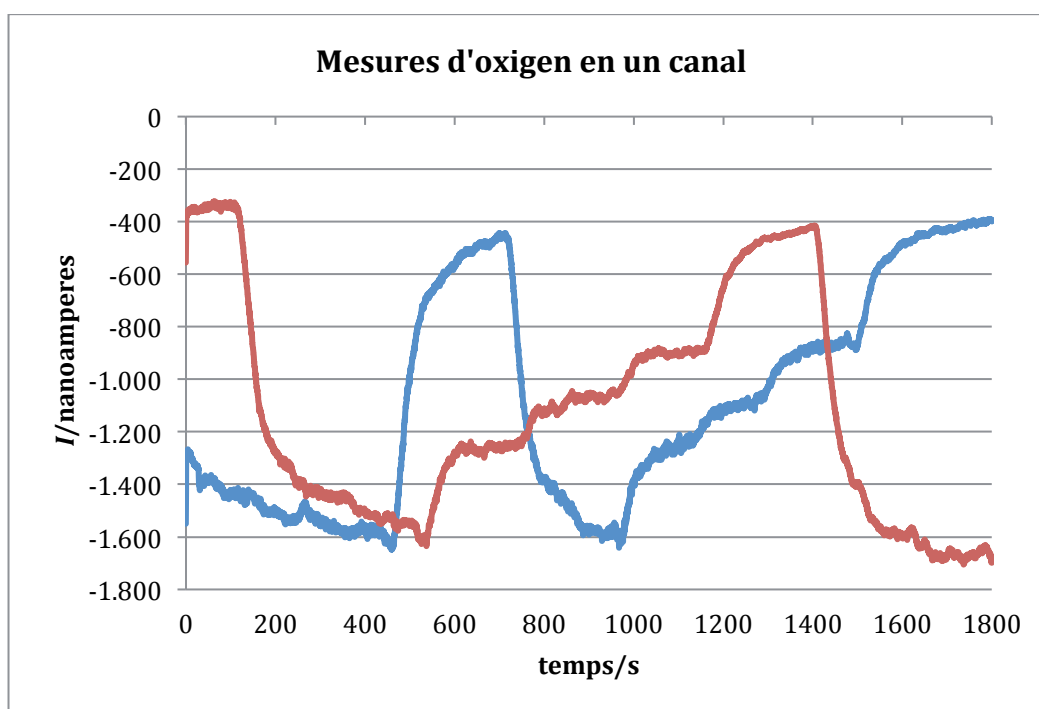
Les concentracions desitjades d'oxigen s'assoleixen mitjançant manòmetres independents per a la pressió de l'aire i l'oxigen. Així, per tenir electròlit a saturació, es bombeja exclusivament aire, i per a zero oxigen es bombeja només nitrogen com es veu al quadre següent:

% de saturació	Aire filtrat	Nitrogen
100	100	0
66	100	50
50	100	100
33	50	100
0	0	100

Taula 4.3. Combinacions d'aire i nitrogen amb les quals s'ha determinat el percentatge de saturació d'oxigen. Els cabals corresponen a ml/minut de gas a 1,5 bar de pressió i 20 °C.

Si bé el mètode no té una alta precisió perquè els valors manomètrics són aproximats en una escala poc precisa i el reservori manté un cert bescanvi amb l'atmosfera, es considera vàlid per fer les primeres aproximacions.

Al gràfic següent s'hi presenten diferents resultats, obtinguts en diferents dies, del corrent mesurat en relació amb la concentració d'oxigen present (gràfic XXXX).



Gràfic 4.5: Mesura de l'oxigen en un canal per a diferents repeticions. S'hi observen els canvis en la concentració d'oxigen per a diferents valors en percentatge [100, 66, 50, 33, 0]. Els valors més negatius corresponen a major presència d'oxigen (100%).

Segons la convenció de la IUPAC, el corrent de reducció pren signe negatiu, de manera que un valor més negatiu implicarà un major corrent de reducció. Al gràfic hi observem que els valors negatius més grans, causats per la reducció d'oxigen, corresponen a la màxima concentració

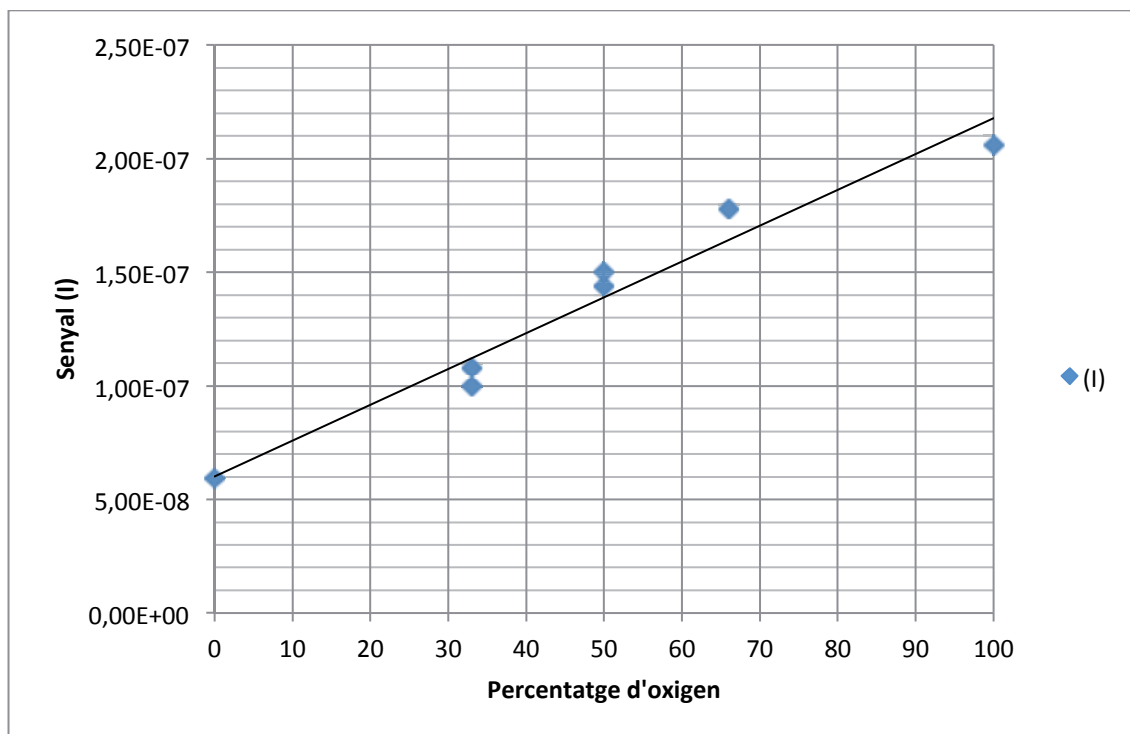
d'oxigen. A banda, també podem observar que a concentració zero d'oxigen no deixa d'obtenir-se un senyal elèctric, cosa que indica certa presència d'oxigen al sistema.

Un aspecte destacable és que els canvis en la concentració d'oxigen (que es fan modificant els manòmetres, sense aturar l'experiment) requereixen un temps de resposta perquè primer s'ha de modificar la concentració al reservori inicial (que conté un volum de líquid d'entre 2 i 3 cm cúbics) i ha de circular pel canal fins arribar al sensor. Aquest canvi de la concentració de gasos s'observa ràpidament, però en el cas més extrem (de 0 a 100 o viceversa) pot tardar entre 200 i 300 segons a establir-se, fet que dificulta l'establiment d'un període idoni d'espera per donar la mesura per vàlida. Cal esmentar que el sensor en si detecta els canvis de concentració instantàniament i que els retards observats es deuen al temps que tarda la mostra a equilibrar-se amb la nova concentració de gasos.

En principi, això no hauria de ser un *handicap* gaire greu per al dispositiu dissenyat, ja que:

1. La mostra té un volum molt menor que el reservori i parteix d'una concentració inicial sense oxigen que no es va variant, mentre que l'electròlit sempre entra a concentració de saturació.
2. La mesura es preveu en continu i, per tant, tot i que pugui induir un cert soroll a les observacions, no és tan determinant definir uns temps concrets de mesura .

Partint de les mesures realitzades s'ha elaborat el gràfic 4.6 per observar la correlació entre la concentració d'oxigen bombejada i la lectura del corrent generat. S'hi observa que la correlació lineal entre les mesures és de  $R^2 = 0,968$ , la qual, tot i no ser òptima, dóna una bona aproximació, tenint en compte la dificultat de precisió tant en la combinació dels gasos al reservori inicial com en la selecció d'un valor estabilitzat de les diferents mesures contínues.



Gràfic 4.6: Mesura d'oxigen en un canal.

CORRENT OBTINGUT

Amb les diferents les configuracions provades, tant pel què fa al cabal com per l'amplada del canal (s'ha treballat amb canals de 500 i 1.000 micres d'amplada), s'obtenen corrents per a l'oxidació de electròlit saturat d'oxigen d'entre  $2 \cdot 10^{-6}$  i  $2 \cdot 10^{-7}$ , i en el cas de l'electròlit al 33% de saturació d'entre  $1,2 \cdot 10^{-6}$  i  $1 \cdot 10^{-7}$ , que estan clarament per sobre dels límits de detecció del potenciostat utilitzat.

Per tant, el dispositiu sembla capaç de generar el corrent suficient per dur a terme les mesures projectades.

#### 4.4.5. PROVES AMB DOS CANALS I MEMBRANA

Un cop validats els aspectes preliminars del dispositiu, com són l'estanqueïtat del xip, el flux laminar, la detecció de l'oxigen present a l'electròlit i la magnitud del senyal obtingut, iniciem la validació de les membranes difusores d'oxigen.

Com s'ha explicat, aquestes membranes han de permetre el pas de l'oxigen present al canal de l'electròlit a la cambra de reacció on és emplaçada la mostra per tal que microorganismes aeròbics l'utilitzin per degradar la matèria orgànica present. Així, monitoritzant en continu l'oxigen restant al final del canal de l'electròlit, es podrà estimar el consum d'oxigen, principalment causat per la degradació aeròbica de la matèria orgànica.

Com ja s'ha apuntat en punts anteriors (3.7.1), aquest és l'element clau del sistema dissenyat i proposat. Amb tot, també és aquí on hem trobat els principals problemes pràctics per a la realització complerta del dispositiu.

Si partim del dispositiu simulat, s'observa clarament que la facilitat a la permeabilitat de l'oxigen a través d'aquesta membrana, estarà directament relacionat amb la qualitat i viabilitat de les mesures obtingudes. És clau, per tant, treballar amb les membranes que presentin una menor dificultat al pas de l'oxigen i, per tant, una major velocitat de transport, que per a un mateix material serà proporcional al gruix de la membrana.

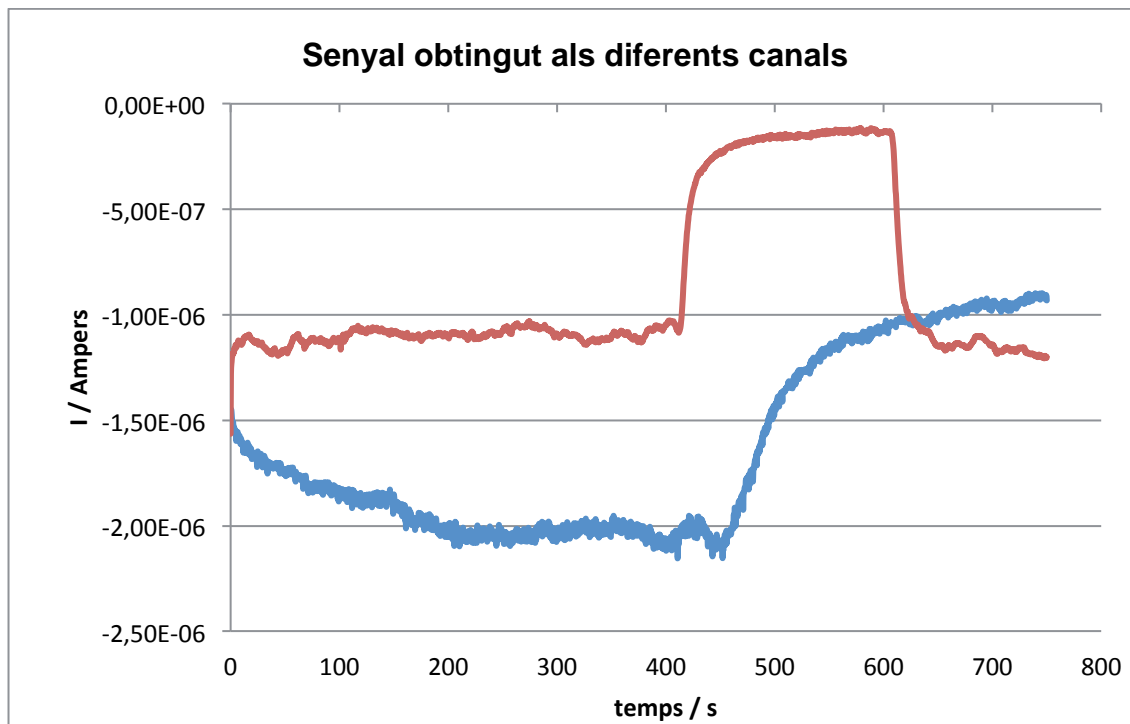
I és precisament aquí on hem tingut les majors dificultats per al desenvolupament del dispositiu. Si bé a l'inici de l'experiment disposàvem de membranes de silicona de 25 micres de gruix, que segons les simulacions prometien uns resultats òptims pel que fa al transport d'oxigen, ràpidament vàrem observar que aquestes membranes no oferien suficient consistència estructural per ser emprades.

No només és una membrana molt fàcilment deformable, que la inhabilita per a una bona separació dels canals i el manteniment dels volums relatius dels mateixos, sinó que ni tant sols podíem tallar-la amb el plòter de tall, ja que la força exercida per la fulla de tall arrossegava la membrana, i la força d'adhesió a la base de tall impedia extreure-la íntegra un cop tallada.

Per tant, provisionalment, com s'ha comentat per les validacions abans explicades, s'ha optat per treballar amb una membrana més estàndard de silicona i de 130 micres de gruix (Goodfellow, Regne Unit). És amb aquesta membrana que s'han fabricat tots els xips analitzats anteriorment, i ha presentat bons resultats tant en evitar la comunicació d'ambdós canals com en el seu manteniment estructural i la durada temporal.

Ara bé, en l'analitzar la seva validesa per a una difusió eficient de l'oxigen, s'han explicat les seves carències. Així, els experiments s'han realitzat omplint el canal de l'electròlit amb electròlit sense oxigen (de forma estàtica, sense transport hidràulic) i fent circular electròlit a diferents concentracions d'oxigen a través del canal que conforma la cambra de reacció.

Al gràfic 4.7 s'hi mostren els resultats d'un dels experiments realitzats: es compara el senyal obtingut fent variacions en la concentració d'oxigen al canal de l'electròlit (línia blava) i al circuit de la cambra de reacció.



Gràfic 4.7: Comparació del senyal obtingut fent circular l'electròlit amb diferents concentracions d'oxigen a través de la cambra de reacció (vermell) o directament pel canal de l'electròlit (blau). Les concentracions d'oxigen són [0,100,0] per aquest darrer i [100,0,100] per ala cambra de reacció. Ambdós canals estan separats per una membrana de silicona de 130 micres i s'observa clarament com la dificultat de l'oxigen per travessar la membrana reverteix en una disminució del senyal observat.

Si bé s'hi observen clarament els canvis provocats en la concentració d'oxigen dissolt que es fa circular per la cambra de reacció (línia vermella), també s'hi observa que hi ha una disminució significativa de la magnitud del senyal obtingut, d'aproximadament el 50% en corrent mesurat.

A més a més, aquest no es recupera tot i deixar més temps el circuit en funcionament, fet que indicaria que el nivell del senyal obtingut correspon al límit de transport d'oxigen a través de la membrana, que n'és l'únic factor limitant. Per tant, podem estimar que amb la superfície o àrea de secció transversal de bescanvi disponible només el 50% de l'oxigen present és capaç de creuar la barrera difusiva que representa la membrana.

Aquests resultats, encara que potencialment es puguin treballar, ens fan ser escèptics pel que fa a la viabilitat d'aquesta membrana de silicona de 130 micres de gruix, ja que comprometen severament el transport d'oxigen, de manera que pot generar zones d'anòxia o de microaerobiosi a la cambra de reacció que, alhora, pot comportar el canvi metabòlic dels microorganismes presents cap a metabolismes anaeròbics que, a part de retardar l'experiment, porten a subestimar la quantitat de matèria orgànica present a la mostra. (Vegeu el punt 3.7.1 de resultats de les simulacions i especialment el cas amb una membrana de 100 micres de gruix).

Algunes vies per intentar resoldre aquest inconvenient poden ser:



1. Incrementar la ràtio de l'àrea de secció transversal de la membrana respecte al volum de la cambra de reacció, per exemple, reduint a la meitat l'alçada de la cambra de reacció (h1) respecte al canal de l'electròlit (h3).
2. Reduir la longitud del dispositiu per tal de minimitzar les zones més susceptibles a presentar situacions de microaerobiosi. (Vegeu punt XXXX de resultats de les simulacions.)
3. Incrementar el cabal de l'electròlit per tal d'incrementar proporcionalment la introducció d'oxigen al sistema.

Tot i aquestes possibles millores en el rendiment del dispositiu, decidim testar altres membranes que potencialment es poden emprar per fer la separació del canal de l'electròlit i la cambra de reacció. Aquest nou enfoc s'explica en el punt següent.

Tot i això, al gràfic 4.7 hi ha una observació que és rellevant i que cal considerar. Com s'ha anat comentant al llarg del treball, l'entrada d'oxigen extern al sistema s'ha intentat reduir per diversos mitjans, ja que és una contaminació que treu exactitud i aporta soroll a l'experiment. Així, s'ha actuat modificant les connexions hidràuliques, fabricant juntes especials de silicona tant per a les connexions hidràuliques amb el xip com al contorn de la carcassa, segellant les vores del xip amb cinta adhesiva i fent circular nitrogen pur per l'interior de la carcassa durant els experiments.

Al gràfic observem clarament que el senyal obtingut en situació de no presència d'oxigen dissolt és clarament inferior quan fem circular la mostra a través de la cambra de reacció en comparació a quan ho fem a través del canal de l'electròlit. Això sembla indicar que les mesures preses per evitar l'entrada d'oxigen al dispositiu són eficaces, ja que d'una altra manera els valors de les dues situacions serien similars si l'entrada d'aquesta "contaminació" d'oxigen es degués a problemes de disseny de les juntes i dels tancaments del dispositiu. Per tant, ens permet concloure que la hipòtesi més provable sigui que aquest oxigen "contaminant" entra al sistema a través del reservori previ del dispositiu on té lloc la barreja de gasos.

#### MEMBRANES DE SEPARACIÓ

Per tal de sortir de l'atzucac on ens trobem amb les membranes de silicona per obtenir un compromís òptim entre consistència estructural i permeabilitat a l'oxigen, decidim analitzar la viabilitat d'utilitzar membranes de separació de materials alternatius.

Així, seleccionem una bateria de membranes de diferents composicions, que a priori poden tenir una bona resposta estructural i alhora permetre un transport d'oxigen suficient. Les membranes seleccionades seran:

- a) Membrana de diàlisi amb porus de 3.500 Dalton
- b) Nafion més membrana hidrofílica
- c) Membrana de silicona de 130 micres
- d) Membrana de silicona de 25 micres
- e) Filtre Millipore FHLP09050
- f) Filtre Millipore FGLP09050
- g) Filtre Millipore PVDF HVHP09050
- h) Filtre Millipore PVDF GVHP09050

A continuació comentem els resultats obtinguts.

#### MEMBRANA DE DIÀLISI AMB PORUS DE 3.500 DALTON

Tot i que no és una membrana que restringeixi el pas de l'aigua, permetria separar molècules orgàniques grans, que poden dur problemes de passivació a l'elèctrode de treball. Es prova en part per encarregar, si es veu viable, membranes amb un pas de porus menor.

Presenta greus problemes per a la seva utilització com a conseqüència de quatre factors importants:

1. Permet el pas de l'aigua tant en sentit transversal com longitudinal, fent que els dos canals es comuniquin i no es pugui controlar la separació del líquid de la mostra i el circulant pel canal de l'electròlit.
2. El transport longitudinal d'aigua a través de la membrana dificulta l'adhesió amb les membranes que conformen els canals, fent que el conjunt del xip es desenganxi. A més a més, incrementa considerablement el volum un cop hidratada.
3. Cal mantenir la membrana hidratada per a la seva conservació, fet que complica la fabricació del xip.

#### NAFION MÉS MEMBRANA HIDROFÍLICA

El Nafion és una membrana en base a PTFE (vegeu el punt XXXX) i, per tant, no destaca per la seva difusibilitat a l'oxigen. A més a més, a causa del seu poc gruix, presenta una baixa integritat estructural. Aquest darrer aspecte s'intenta resoldre afegint-hi una membrana hidrofílica amb adhesiu que li doni la resistència estructural necessària i que permeti l'arribada de l'aigua a la superfície del Nafion per facilitar el bescanvi d'oxigen.

El fet d'utilitzar aquesta membrana hidrofílica, si bé resol parcialment les debilitats estructurals del Nafion, comporta, com en el cas de la membrana de diàlisi, que hi hagi transport longitudinal d'aigua a través seu. Així si bé el Nafion és ben conegut per la seva impermeabilitat a l'aigua, aquest transport a través de la membrana hidrofílica fa que es comuniquin ambdós canals a través de les obertures que permeten l'alineament de les diferents membranes i la conformació dels circuits fluídics.

#### MEMBRANA DE SILICONA DE 130 MICRES

Aquesta és essencialment la membrana a la qual ens hem referit amb els experiments comentats amb anterioritat. A nivell hidràulic no presenta problemes rellevants i manté bé la separació dels dos canals.

Presenta, però, un limitat transport d'oxigen a través seu que en dificulta l'ús per als fins projectats.

#### MEMBRANA DE SILICONA DE 25 MICRES

També comentada amb anterioritat. El principal problema que presenta és la baixa consistència estructural, tot i que tindria un bon comportament en el transport d'oxigen.

Només seria viable el seu ús mitjançant un tractament o addició que n'incrementés l'estructura.

#### FILTRE MILLIPORE FHLP09050

Aquesta membrana és hidrofòbica i presenta uns porus de 0,45 micres de gruix.

Tot i ser hidrofòbica, la mida dels porus acaba permetent el pas de l'aigua de manera que es comuniquen els dos canals i fa que no sigui viable per als nostres objectius.

#### FILTRE MILLIPORE FGLP09050

Similar a l'anterior en composició i característiques, té uns porus de 0,22 micres de diàmetre.

Presenta els mateixos problemes que la membrana amb porus de 0,45 micres.

#### **FILTRE MILLIPORE PVDF HVHP09050**

Membrana també hidrofòbica de la casa Millipore amb porus de 0,45 micres de diàmetre i un gruix de 92 micres. Per la seva composició, la força hidrofòbica és major i permet la separació efectiva dels líquids entre el canal de l'electròlit i la cambra de reacció.

Mostra bons resultats hidràulics tan fent funcionar el sistema en succió com en perfusió.

No s'hi arriben a fer proves de transport d'oxigen, però el fet de disposar de porus oberts que permeten un bon bescanvi de gasos la mostra una alternativa vàlida a la silicona.

#### **FILTRE MILLIPORE PVDF GVHP09050**

Membrana també hidrofòbica de la casa Millipore amb porus de 0,22 micres de diàmetre i un gruix de 92 micres. Per la seva composició, la força hidrofòbica és major i permet la separació efectiva dels líquids entre el canal de l'electròlit i la cambra de reacció.

Mostra bons resultats hidràulics tan fent funcionar el sistema en succió com en perfusió.

No s'hi arriben a fer proves de transport d'oxigen, però el fet de disposar de porus oberts que permeten un bon bescanvi de gasos la mostra una alternativa vàlida a la silicona. Comparativament amb la de porus de 0,45 micres, aquesta pot ser fins i tot més adequada per a l'ús en el dispositiu.

## 4.5. CONCLUSIONS

Tècniques de fabricació:

- i. Les tècniques de microfabricació i sala blanca permeten una alta precisió en mides petites.
- ii. Impliquen però uns alts costos i requeriments de temps, pel que només s'han utilitzat en la fabricació de microelèctrodes, substituint-se per altres tècniques els demés elements del dispositiu.
- iii. Les tècniques de prototipatge ràpid s'han mostrat pràctiques, ràpides i econòmiques per la fabricació de la major part dels elements del dispositiu.
- iv. El tall de membranes amb ploter ofereix uns bons acabats i son especialment adequades per la fabricació de canals microfluídics.
- v. El tall de membranes amb làser, promet ser una tècnica adequada, però cal desenvolupar millor els protocols per no afectar als materials.
- vi. El micro-fresat és una eina molt adequada per la fabricació d'elements com les carcasses. No és tant fàcilment aplicable a altres parts de la fabricació com el tall de membranes.

Sistema microfluídic:

- vii. Els canals microfluídics fabricats a partir de membranes, presenten un bon funcionament general i una gran facilitat de fabricació i muntatge dels xips.
- viii. L'alineament per agulles (pin d'alineació) permet un bon alineament de les diferents capes que conformen el xip.
- ix. Cal millorar el protocol de pressió aplicada sobre els xips, per evitar que l'adhesiu d'unió de les diferents capes s'introdueixi als canals fluídics. Cal esmentar que aquesta intrusió no s'ha observat en tots els casos i sempre que s'ha observat era amb xips bastant utilitzats.
- x. Les juntes a prova d'aigua fabricades amb membranes ofereixen un millor comportament que les juntes tòriques convencionals, ja que fan un millor repartiment de la pressió exercides, millorant el funcionament dels canals microfluídics.

Validació experimental:

- xi. El dispositiu presenta un bon comportament hidrodinàmic i concordant amb els cabals bombejats. Això és cert per un ampli rang de cabals i pressions, tant en succió com en perfusió.
- xii. El pH pot afectar significativament els voltatges idonis de mesura, ja que condiciona el potencial al que s'inicien processos de reducció de l'hidrogen que poden confondre's amb la reducció de l'oxigen. Cal analitzar amb més profunditat els potencials de mesura utilitzats en funció del pH.
- xiii. Seria interessant poder mesurar el pH de la mostra en estudi amb el mateix dispositiu, a fi de poder adaptar automàticament el potencial de mesura per a la mostra.
- xiv. La millor configuració d'elèctrodes/suport de les analitzades és el de Au/Cr sobre vidre. Algunes de les configuracions no han donat tant bon resultat, però segurament es deu parcialment a la fabricació, i per tant caldria refinar aquest apartat. (vegeu la taula 4.1)
- xv. Les proves amb un sol canal han permès comprovar que el dispositiu respon bé al rang de cabals i pressions aplicat.
- xvi. S'ha comprovat que hi ha una bona correlació entre el cabal circulant, el contingut d'oxigen i el senyal electroquímic registrat. Això recolza la viabilitat del disseny per a les mesures que es volen realitzar.

- xvii. Caldria evitar les entrades d'oxigen extern (segurament al propi dipòsit d'alimentació del dispositiu) per a una millor validació experimental del dispositiu.
- xviii. Les membranes de separació entre la cambra de reacció i el canal de l'electròlit, s'han mostrat com el punt més dèbil del disseny i fabricació del dispositiu.
- xix. Les membranes de silicona equivalents al model simulat, no ofereixen una suficient consistència estructural com per a ser emprades.
- xx. Les membranes de silicona que ofereixen un bon comportament estructural (130  $\mu\text{m}$  de gruix), presenten un retard significatiu en el transport d'oxigen. Caldria trobar materials amb un millor comportament.
- xxi. Al final de la fase experimental i de validació s'ha disposat d'una gama de membranes que s'han analitzat:

Membranes	Validesa	comentari
Diàlisi	No	Es comuniquen tots els canals. Es una membrana amb porus de 3.500 Daltons i l'aigua la travessa lliurement
Nafion + hidrofílica Adhesive research	No	Es comuniquen tots els canals. En principi el Nafion és impermeable o gairebé, però sembla que l'aigua circula a través de la membrana hidrofílica de suport. Es pot provar canviant l'ordre de les membranes de Nafion i hidrofílica, però igualment els canals d'entrada són comuns...
Silicona 100-250 $\mu\text{m}$	Sí	Amb molt poca pressió sembla funcionar bé. Els canals funcionen de forma independent! Cal comprovar gruix real de la membrana!!! Gruix: $0,141 \text{ mm Var}/n-1 = 9.666 \cdot 10^{-5}$
Milipore FHLP09050	No	Membrana de 0,45 $\mu\text{m}$ de porus: surt l'aigua per tot arreu, abans que pel canal... tot i ser hidrofòbica, sembla que té molt transport lateral. No se m'acut com limitar-ho... He provat fins a una pressió de roscat molt superior a la normal, però segueix igual...
Milipore FGLP09050	No	Membrana de 0,22 $\mu\text{m}$ de porus: surt l'aigua per tot arreu, abans que pel canal... tot i ser hidrofòbica, sembla que té molt transport lateral. No se m'acut com limitar-ho... He provat fins a una pressió de roscat molt superior a la normal, però segueix igual...
Milipore PVDF HVHP09050	Sí	Porus de 0,45 $\mu\text{m}$ . Funciona molt bé tant en perfusió com en succió! Pressió de tancament mitjana (quallat + 1/4 a 1/2 de rosca). A més a més, en tenim de 0,22 $\mu\text{m}$ . Gruix: $0,091666 \text{ mm var}/n-1 = 1.666 \cdot 10^{-5}$
Milipore PVDF GVHP09050	Sí	Porus de 0,22 $\mu\text{m}$ . Funciona molt bé tant en perfusió com en succió! Pressió de tancament mitjana (quallat + 1/4 a 1/2 de rosca). A més a més, en tenim de 0,22 $\mu\text{m}$ . Gruix: $0,091666 \text{ mm var}/n-1 = 1.666 \cdot 10^{-5}$

Taula 4.4: Comentari de les principals membranes provades.

- xxii. Algunes d'aquestes semblen oferir resultats prometedors, que caldrà constatar en futurs tests experimentals (marcades amb verd a la taula)
- xxiii. Les característiques comunes de les membranes que han mostrat un millor resultat és que son hidrofòbiques, indistintament de si tenen porus microfabricats o no.
- xxiv. Això implica que una part del transport de l'oxigen es farà en forma gasosa. Aquest aspecte no està directament contemplat en el model utilitzat en les simulacions i podria ser una millora rellevant de cara a futurs desenvolupaments.
- xxv. Les membranes amb porus presenten unes bones característiques de resistència física.
- xxvi. Tant la mida del porus com la interrupció de la continuïtat del líquid, haurien de prevenir el pas de molècules i compostos que no puguin passar a una fase gasosa amb les condicions del dispositiu. Això és un element molt limitant per a la majoria de compostos, però s'hauria de validar experimentalment i fer especial atenció a l'efecte

de les pressions que es donen en conducte microfluídics i de compostos orgànics volatilitzables.

## 4.6. BIBLIOGRAFIA

- Anon, 2010. An innovative reactor-type biosensor for BOD rapid measurement. 25(7), pp.1705–1709.
- Anon, 2002. Microbial BOD sensors for wastewater analysis., 36(15), pp.3786–3802.
- Compton, R.G. & Winkler, J., 1995. Hydrodynamic Voltammetry with Channel Microband Electrodes: Alternating Current Impedance Measurements. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(14), pp.5029–5034.
- Cooper, J.A. & Compton, R.G., 1998. Channel Electrodes — A Review. *Electroanalysis*, 10(3), pp.141–155.
- del Campo, F.J., 2014. Miniaturization of electrochemical flow devices. *Electrochemistry Communications*, 45, pp.91–94.
- Godino Amado, N. et al., 2010. *Design and fabrication of miniaturised electroanalytical systems*, Universitat Autònoma de Barcelona. Available at: <http://ddd.uab.cat/record/68249>.
- Li, X., Ballerini, D.R. & Shen, W., 2012. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. *Biomicrofluidics*, 6(1), pp.11301–1130113.
- Ordeig, O. et al., 2007. Electroanalysis Utilizing Amperometric Microdisk Electrode Arrays. *Electroanalysis*, 19(19-20), pp.1973–1986.
- Process, I.T.G.O.R.I.C.O.T.A.S., 2011. *Respirometry in Control of the Activated Sludge Process: Benchmarking Control Strategies* 2002nd ed. J. B. C. H. S. P. A. Vanrolleghem, ed., IWA Publishing.
- Stone, H.A., Stroock, A.D. & Ajdari, A., 2004. ENGINEERING FLOWS IN SMALL DEVICES. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 36(1), pp.381–411.