



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**

**2023**

**ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA  
MONITORIZACIÓN DE SUSTANCIAS  
INHIBIDORAS DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS  
IMPLICADOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS  
RESIDUALES**

**María Alejandra Vargas Muñoz**



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**

**2023**

**Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología  
Química**

**ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA  
MONITORIZACIÓN DE SUSTANCIAS  
INHIBIDORAS DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS  
IMPLICADOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS  
RESIDUALES**

**María Alejandra Vargas Muñoz**

**Directora: Gemma Isabel Turnes Palomino**

**Director: Edwin Palacio**

**Tutor: José Manuel Estela Ripoll**

**Doctora por la Universitat de les Illes Balears**



**Universitat**  
de les Illes Balears

La Dra. Gemma Isabel Turnes Palomino y el Dr. Edwin Palacio, ambos profesores de la Universitat de les Illes Balears

DECLARAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Estrategias analíticas para la monitorización de sustancias inhibidoras de los procesos biológicos implicados en el tratamiento de aguas residuales*, presentada por María Alejandra Vargas Muñoz para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo nuestra supervisión y que cumple con los requisitos necesarios para optar al título de Doctor Internacional.

Y para que quede constancia de ello firmamos este documento.

Firmas,

Dra. Gemma Isabel Turnes Palomino

Dr. Edwin Palacio

Palma de Mallorca, Julio 20 de 2023

# Índice

<b>Índice de figuras y tablas</b> .....	<b>i</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>viii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>xii</b>
<b>Resum</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Listado de publicaciones</b> .....	<b>xviii</b>
<b>CAPÍTULO 1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1.    Introducción general.....	2
1.2.    Tratamientos biológicos de aguas residuales .....	3
1.3.    Sustancias inhibitorias.....	5
1.4.    Química analítica verde y miniaturización.....	6
1.5.    Técnicas de extracción y preconcentración.....	7
1.5.1.    Extracción líquido-líquido y microextracción líquido-líquido dispersiva.....	8
1.5.2.    Extracción en fase sólida.....	10
1.5.2.1.    Redes metal-orgánicas.....	12
1.6.    Técnicas de análisis en flujo.....	12
1.6.1.    Análisis por inyección secuencial .....	13
1.6.2.    Análisis por inyección en flujo multijeringa .....	14
1.6.3.    Laboratorio en jeringa ( <i>lab-in-syringe</i> ) y microextracción líquido-líquido dispersiva en jeringa ( <i>in-syringe-DLLME</i> ).....	15
1.7.    Tecnología de impresión 3D .....	17
1.7.1.    Estereolitografía .....	17
1.7.2.    Modelado por deposición fundida.....	19
1.8.    Dispositivos analíticos basados en papel.....	20
1.8.1.    Colorimetría de imágenes digitales .....	21
<b>CAPÍTULO 2. Objetivos</b> .....	<b>24</b>
2.1.    Objetivo general .....	25
2.2.    Objetivos específicos.....	25
<b>CAPÍTULO 3. Materiales y métodos</b> .....	<b>23</b>

3.1. Instrumentación de los sistemas de análisis en flujo .....	28
3.1.1. Módulo multijeringa.....	28
3.1.2. Válvulas.....	30
3.1.2.1. Válvula solenoide.....	30
3.1.2.2. Módulo de válvulas .....	31
3.1.3. Automuestreador .....	32
3.1.4. Sistema de agitación magnética asistida en jeringa para DLLME .....	33
3.1.5. Tuberías y conectores .....	34
3.1.6. Software AutoAnalysis .....	34
3.1.6.1. Configuración del Hardware .....	35
3.1.6.2. Desarrollo del método .....	36
3.2. Técnicas instrumentales .....	37
3.2.1. Espectroscopía ultravioleta-visible.....	37
3.2.1.1. Espectrofotómetro Ocean Optics.....	38
3.2.2. Cromatografía.....	39
3.2.2.1. Cromatografía líquida .....	40
3.2.2.1.1. Detector de diodos.....	40
3.2.2.2. Cromatografía de gases .....	42
3.2.2.2.1. Detector de ionización de llama .....	42
3.2.2.2.2. Espectrómetro de masas .....	43
3.2.3. Difracción de rayos X .....	45
3.2.4. Adsorción/desorción física de gases.....	46
3.2.5. Microscopía electrónica de barrido .....	47
3.3. Diseño e impresión 3D.....	47
3.3.1. Diseño .....	47
3.3.2. Impresión.....	48
3.3.3. Limpieza y curado.....	49
3.3.4. Medidas de seguridad.....	49
3.4. Programa ImageJ.....	50
3.5. Metodología de optimización experimental .....	52
3.5.1. Diseño experimental en la optimización multivariante .....	52
3.5.1.1. Función sumatoria de respuestas normalizadas.....	55

**CAPÍTULO 4. Desarrollo de un método automatizado de microextracción líquido-líquido dispersiva en jeringa previo al análisis por GC-FID para la determinación de ácidos grasos volátiles en procesos anaerobios y aguas residuales..... 57**

4.1. Introducción .....	58
4.1.1. Generalidades de los ácidos grasos volátiles.....	58

4.1.2.	Antecedentes en el análisis de ácidos grasos volátiles .....	59
4.2.	Resumen y discusión.....	60
4.3.	Artículo original .....	62

**CAPÍTULO 5. Desarrollo de un sistema automatizado de microextracción líquido-líquido dispersiva en jeringa y un método GC-MS sin derivatización para la determinación de ácidos grasos de cadena larga en digestores anaerobios y aguas residuales de almazara .. 64**

5.1.	Introducción .....	65
5.1.1.	Generalidades de los ácidos grasos de cadena larga .....	65
5.1.2.	Antecedentes en el análisis de AGCL .....	66
5.2.	Resumen y discusión.....	67
5.3.	Artículo original .....	68

**CAPÍTULO 6. Desarrollo de un método basado en sensores de papel y un sistema colorimétrico portable impreso en 3D para la detección de amoníaco y sulfuro en digestores anaerobios y aguas residuales ..... 70**

6.1.	Introducción .....	71
6.1.1.	Generalidades del amoníaco.....	71
6.1.2.	Antecedentes en el análisis de amoníaco .....	72
6.1.3.	Generalidades del sulfuro.....	73
6.1.4.	Antecedentes en el análisis de sulfuro.....	74
6.2.	Resumen y discusión.....	76
6.3.	Artículo original .....	77

**CAPÍTULO 7. Desarrollo de un método de extracción en fase sólida y un sistema espectrofotométrico portable impreso en 3D para la preconcentración y análisis de hierro en diferentes tipos de muestras de agua ..... 79**

7.1.	Introducción .....	80
7.1.1.	Generalidades del hierro.....	80
7.1.2.	Antecedentes en el análisis de hierro .....	80
7.2.	Resumen y discusión.....	82
7.3.	Artículo original .....	83

**CAPÍTULO 8. Desarrollo de un agitador portable impreso en 3D con paletas recubiertas de una red metal-orgánica para la extracción *in-situ* de compuestos fenólicos en biodigestores y aguas residuales..... 85**

8.1.	Introducción .....	86
8.1.1.	Generalidades de los fenoles .....	86

8.1.2. Antecedentes en el análisis de fenoles .....	89
8.2. Resumen y discusión.....	90
8.3. Artículo original .....	91
<b>CAPÍTULO 9. Conclusiones finales .....</b>	<b>93</b>
Conclusiones .....	94
Conclusions .....	97
<b>Referencias.....</b>	<b>101</b>





# Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.1.</b> Esquema representativo de las etapas de la digestión anaerobia .....	4
<b>Figura 1.2.</b> Esquema representativo del proceso de DLLME-MSA propuesto por Zhang y colaboradores .....	9
<b>Figura 1.3.</b> Esquema representativo de los pasos básicos del procedimiento SPE .....	11
<b>Figura 1.4.</b> Esquema representativo del <i>manifold</i> de un sistema SIA .....	14
<b>Figura 1.5.</b> Esquema representativo del <i>manifold</i> de un sistema MSFIA .....	15
<b>Figura 1.6.</b> Esquema representativo de la DLLME-MSA.....	16
<b>Figura 1.7.</b> Esquema representativo de la estereolitografía invertida .....	18
<b>Figura 1.8.</b> Esquema representativo de una impresora de modelado por deposición fundida ...	19
<b>Figura 3.1.</b> Módulo multijeringa de Crison y esquema de la vista frontal de la multijeringa....	29
<b>Figura 3.2.</b> Panel trasero de la multijeringa y dispositivo auxiliar.....	30
<b>Figura 3.3.</b> Válvula solenoide externa.....	30
<b>Figura 3.4.</b> Módulo de válvulas.....	31
<b>Figura 3.5.</b> Esquema representativo de las posiciones de carga e inyección de la IV.....	32
<b>Figura 3.6.</b> Muestreador automático de Crison .....	32
<b>Figura 3.7.</b> Esquema del sistema de agitación magnética .....	34
<b>Figura 3.8.</b> Menú Hardware de AutoAnalysis.....	35
<b>Figura 3.9.</b> Menú Editor de AutoAnalysis .....	37
<b>Figura 3.10.</b> Espectrofotómetros Ocean Optics .....	39
<b>Figura 3.11.</b> Esquema representativo del funcionamiento del detector de matriz de diodos .....	41
<b>Figura 3.12.</b> Esquema representativo de un FID.....	43
<b>Figura 3.13.</b> Esquema representativo de un analizador MS cuadrupolo .....	44
<b>Figura 3.14.</b> Esquema representativo de los componentes del XRD .....	46
<b>Figura 3.15.</b> Impresoras 3D.....	48
<b>Figura 3.16.</b> Ventana principal de ImageJ y sus herramientas.....	51
<b>Figura 3.17.</b> Esquema representativo de un diseño factorial completo $2^3$ .....	53
<b>Figura 3.18.</b> Esquema representativo de un diseño central compuesto de dos factores .....	55
<b>Tabla 4.1.</b> Características generales de los AGV estudiados .....	59
<b>Tabla 5.1.</b> Características generales de los AGCL estudiados .....	65
<b>Figura 6.1.</b> Mecanismo de reacción del indicador BTB en la detección de amoníaco.....	73
<b>Figura 6.2.</b> Reacción colorimétrica de Fisher .....	75
<b>Figura 7.1.</b> Formación del complejo de ferroína.....	82
<b>Tabla 8.1.</b> Características generales de los fenoles estudiados.....	88



# Agradecimientos

Hace cuatro años no habría imaginado que llegaría a este punto de mi vida, donde estoy escribiendo los agradecimientos de mi tesis doctoral. Esta ha sido una de las etapas más desafiantes en mi vida, pero también, una de las que me ha llenado de más felicidad hasta ahora. Por ello, quisiera agradecer a todos aquellos que me han brindado su valiosa ayuda a lo largo de estos años y han hecho posible que me encuentre aquí hoy.

En primer lugar, me gustaría expresar mis agradecimientos a mis directores de tesis, la Dra. Gemma Turnes y el Dr. Edwin Palacio, por su inmenso apoyo, amabilidad, confianza y colaboración en mi investigación. Gracias Edwin por creer en mí desde que llegue a la UIB.

También quiero agradecer a todos aquellos que están o han pasado por los grupos de Química Analítica Ambiental y Química de Materiales, y a los técnicos de los Servicios Cientificotécnicos de la UIB, por echarme una mano cuando lo necesitaba.

Especialmente, agradezco a la Dra. Laura Ferrer y al Dr. Víctor Cerdà por sus consejos, positivismo, sabiduría y gran ayuda. Igualmente, agradezco a todos mis compañeros del laboratorio, por haber hecho más ameno cada día, por las charlas, las comidas de celebración y nuestras aventuras en los congresos.

Gracias al Laboratoire de Chimie de l'Environnement por acogerme y ayudarme durante mi estancia en Francia. Muchas gracias a mi tutor, el Dr. Jean-Luc Boudenne, y a sus colaboradores: el Dr. Fabien Robert-Peillar y el Dr. Bruno Coulomb. Agradezco enormemente su supervisión, cortesía y conocimientos.

Gracias también a Gaspar y a Pepa por colaborarme tan amablemente en los trámites de mi visado y el de mi esposo.

Esta tesis deseo dedicarla a toda mi familia en Colombia y a mi esposo Diego. Gracias mamá, Liliana, por transmitirme tu paciencia y por enseñarme a ser responsable. Gracias papá, Luis, por enseñarme a ser fuerte y perseverante en mis metas. Todas esas virtudes me han servido para llegar hasta aquí hoy. Gracias infinitas a los dos por su valioso apoyo y confianza. Hemos estado lejos, pero los llevo en mi alma. Gracias abuelita Alcira por tus oraciones y bendiciones. Gracias tía Marina. Tita te me fuiste muy rápido, no tuve la oportunidad de despedirme de ti. Me hubiera encantado compartir este momento contigo. Mil gracias a las dos por su apoyo moral y económico.

Gracias a mi amado esposo Diego, por su compañía, por darme ánimos en mí doctorado y, por ayudarme y sacarme una sonrisa todos los días, después de llegar cansada a casa. Estos años han sido más alegres y divertidos a tu lado. Gracias también a mi suegra y cuñada por su apoyo de todo tipo.

Gracias a los mejores *roomies*, Estefanía y Ramón, por echarme porras, por apoyarnos, por las comidas y por las risas.

Gracias universo por haber puesto tan buenas personas en mi camino estos años. Un gran abrazo a todos.

Alejandra Vargas agradece al Ministerio español de Educación y Ciencia por la ayuda de Formación del Profesorado Universitario (FPU19/06082) para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.



También agradece a la Escuela de Doctorado de la Universitat de les Illes Balears (EDUIB) y al Banco Santander por la beca de movilidad EDUIB – Santander Universidades 2021-2022 para una estancia de tres meses en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad de Aix-Marsella (Marsella, Francia).



Esta tesis hace parte de los siguientes proyectos de investigación:

- Direcció General de Política Universitaria i Recerca – Comunitat Autònoma de les Illes Balears (proyecto PRD2018/45).



G CONSELLERIA  
 O FONS EUROPEUS,  
 I UNIVERSITAT I CULTURA  
 B DIRECCIÓ GENERAL  
 / POLÍTICA UNIVERSITÀRIA  
 I RECERCA

- Ministerio de Ciencia e Innovación y Agencia Estatal de investigación (proyecto PID2019-107604RB-I00 /MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033).





# Abreviaturas

<b>2-CP</b>	2-clorofenol ( <i>2-chlorophenol</i> )
<b>2D-NLFDT</b>	2D Teoría del funcional de la densidad no local ( <i>two-dimensional non-local density functional theory</i> )
<b>3D</b>	Tercera dimensión
<b>4-CP</b>	4-clorofenol ( <i>4-chlorophenol</i> )
<b>4-NP</b>	4-nitrofenol ( <i>4-nitrophenol</i> )
<b>2,4-DCP</b>	2,4-diclorofenol ( <i>2,4-dichlorophenol</i> )
<b>2,4,6-TCP</b>	2,4,6-triclorofenol ( <i>2,4,6-trichlorophenol</i> )
<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>AGVT</b>	Ácidos grasos volátiles totales
<b>AGCL</b>	Ácidos grasos de cadena larga
<b>AM</b>	Fabricación aditiva ( <i>additive manufacturing</i> )
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza ( <i>analysis of variance</i> )
<b>APHA</b>	Asociación Americana de Salud Pública – ( <i>American Public Health Association</i> )
<b>BET</b>	Brunauer-Emmett-Teller
<b>BPA</b>	Bisfenol A ( <i>bisphenol A</i> )
<b>BRH</b>	Bacterias reductoras de hierro
<b>BSR</b>	Bacterias sulfato-reductoras
<b>BTB</b>	Azul de bromotimol ( <i>bromothymol Blue</i> )
<b>CAD</b>	Diseño asistido por computadora ( <i>computer aided design</i> )
<b>CCD</b>	Dispositivo de carga acoplada ( <i>charge-coupled device</i> )
<b>CDM</b>	Carbonato de dimetilo
<b>CE</b>	Electroforesis capilar ( <i>capillary electrophoresis</i> )
<b>CF</b>	Cloroformo
<b>CMYK</b>	Cian, magenta, amarillo, negro ( <i>cyan, magenta, yellow, key</i> )
<b>CP</b>	Clorofenoles ( <i>chlorophenols</i> )
<b>d</b>	Diámetro

---

<b>DA</b>	Digestión anaerobia
<b>DAD</b>	Detector de matriz/arreglo de diodos ( <i>diode array detector</i> )
<b>DAE</b>	Dispositivo de agitación externo
<b>DCC</b>	Diseño central compuesto
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DCP</b>	Diclorofenoles ( <i>dichlorophenols</i> )
<b>d.e.</b>	Diámetro externo
<b>DG</b>	Difusión gaseosa
<b>d.i.</b>	Diámetro interno
<b>DIC</b>	Colorimetría de imágenes digitales ( <i>digital image colorimetry</i> )
<b>DLLME</b>	Microextracción líquido-líquido dispersiva ( <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i> )
<b>DLPME</b>	Microextracción en fase líquida dispersiva ( <i>dispersive liquid-phase microextraction</i> )
<b>DLL</b>	Biblioteca de enlace dinámico ( <i>dynamic link library</i> )
<b>DMPD</b>	N,N-dimetil-p-fenilendiamina ( <i>N,N-dimethyl-p-phenylenediamine</i> )
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>EC</b>	Contaminantes emergentes ( <i>emerging contaminants</i> )
<b>ECD</b>	Detector de captura de electrones ( <i>electron capture detector</i> )
<b>EDAR</b>	Estación depuradora de agua residual
<b>EDS</b>	Espectroscopía de rayos X de dispersión de energía ( <i>energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> )
<b>EI</b>	Impacto electrónico ( <i>electron impact</i> )
<b>ER</b>	<i>Extraction recovery</i> (recuperación de la extracción)
<b>ETAAS</b>	Espectrometría de absorción atómica electrotérmica ( <i>electrothermal atomic absorption spectroscopy</i> )
<b>FAAS</b>	Espectrometría de absorción atómica de llama ( <i>flame atomic absorption spectrometry</i> )
<b>FDM</b>	Modelado por deposición fundida ( <i>fused deposition modeling</i> )
<b>FIA</b>	Análisis por inyección en flujo ( <i>flow injection analysis</i> )
<b>FID</b>	Detector de ionización de llama ( <i>flame ionization detector</i> )
<b>FSRN</b>	Función sumatoria de respuestas normalizadas



---

<b>GC</b>	Cromatografía de gases ( <i>gas chromatography</i> )
<b>GF-AAS</b>	Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito ( <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> )
<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrógeno
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>HSV</b>	Tonalidad, saturación, valor ( <i>hue, saturation, brightness</i> )
<b>H</b>	<i>High</i> (altura)
<b>Hx</b>	Hexano
<b>IAD</b>	Inyección acuosa directa
<b>IC</b>	Cromatografía iónica ( <i>ionic chromatography</i> )
<b>ICP-OES</b>	Espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente ( <i>inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy</i> )
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente ( <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
<b>i.e.</b>	Es decir
<b>JCR</b>	<i>Journal Citation Reports</i>
<b>L</b>	Longitud
<b>LLE</b>	Extracción líquido-líquido ( <i>liquid-liquid extraction</i> )
<b>LIS</b>	Laboratorio en jeringa ( <i>lab-in-syringe</i> )
<b>LC</b>	Cromatografía líquida ( <i>liquid chromatography</i> )
<b>LCFA</b>	<i>Long-chain fatty acids</i> (ácidos grasos de cadena larga)
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>LED</b>	Diodo emisor de luz ( <i>light emitting diode</i> )
<b>LOM</b>	Fabricación de objetos laminados ( <i>laminated object manufacturing</i> )
<b>LPME</b>	Microextracción en fase líquida ( <i>liquid-phase microextraction</i> )
<b>M</b>	Motor
<b>MB</b>	Azul de metileno ( <i>methylene blue</i> )
<b>MCFIA</b>	Análisis en flujo multiconmutado ( <i>multicommutated flow injection analysis</i> )
<b>MIL</b>	Material del Instituto Lavoisier
<b>MOF</b>	Red metal-orgánica ( <i>metal-organic framework</i> )

---

<b>MPV</b>	Válvula de multiposición ( <i>multiposition valve</i> )
<b>MS</b>	Espectrometría de masas ( <i>mass spectrometry</i> )
<b>MSA</b>	Agitación magnética asistida ( <i>magnetic stirring assisted</i> )
<b>MSFIA</b>	Análisis por inyección en flujo multijeringa ( <i>multisyringe flow injection analysis</i> )
<b>MSM</b>	Módulo multijeringa ( <i>multisyringe module</i> )
<b>MTBE</b>	Metil <i>ter</i> -butil éter
<b>NP</b>	Nitrofenoles ( <i>nitrophenols</i> )
<b>PAD</b>	Dispositivos analíticos basados en papel ( <i>paper analytical devices</i> )
<b>PCP</b>	Pentaclorofenol ( <i>pentachlorophenol</i> )
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>p.ej.</b>	Por ejemplo
<b>PEEK</b>	Polieteretercetona ( <i>polyether ether ketone</i> )
<b>PLA</b>	Poliácido láctico ( <i>polylactic acid</i> )
<b>PMMA</b>	Polimetilmetacrilato
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>PV</b>	Pervaporación
<b>PVC</b>	Policloruro de vinilo ( <i>polyvinyl chloride</i> )
<b>REACH</b>	Reglamento de Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas ( <i>registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals - regulation</i> )
<b>RSDs</b>	Desviaciones estándar relativas ( <i>relative standard deviations</i> )
<b>RGB</b>	Rojo, verde, azul ( <i>red, green, blue</i> )
<b>S</b>	<i>Syringe</i> (jeringa)
<b>SBSE</b>	Extracción por sorción con barra agitadora ( <i>stir bar sorptive extraction</i> )
<b>SBU</b>	Unidades de construcción secundaria ( <i>secondary building units</i> )
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido ( <i>scanning electron microscope</i> )
<b>SIA</b>	Análisis por inyección secuencial ( <i>sequential injection analysis</i> )
<b>SIM</b>	Monitorización de iones seleccionados o de ion único ( <i>selected ion monitoring or single ion monitoring</i> )
<b>SLA</b>	Estereolitografía ( <i>stereolithography</i> )

---

<b>SLS</b>	Sinterización selectiva por láser ( <i>selective laser sintering</i> )
<b>SFA</b>	Análisis en flujo segmentado ( <i>segmented flow analysis</i> )
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida ( <i>solid-phase extraction</i> )
<b>SPME</b>	Microextracción en fase sólida ( <i>solid-phase microextraction</i> )
<b>STL</b>	Formato de archivo informático para impresión 3D y CAD ( <i>STereoLithography</i> )
<b>SV/ V</b>	<i>Solenoid valve</i> (válvula solenoide)
<b>TCP</b>	Triclorofenoles ( <i>trichlorophenols</i> )
<b>TeCP</b>	Tetraclorofenoles ( <i>tetrachlorophenols</i> )
<b>UA</b>	Unidades arbitrarias
<b>USB</b>	Bus universal en serie ( <i>universal serial bus</i> )
<b>USEPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ( <i>United States Environmental Protection Agency</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta visible
<b>VFA</b>	<i>Volatile fatty acids</i> (ácidos grasos volátiles)
<b>WWTPs</b>	<i>Wastewater treatment plants</i> (estaciones de depuración de agua residual)
<b>XRD</b>	Difracción de rayos X ( <i>X-ray diffraction</i> )

# Resumen

La creciente sobreexplotación y contaminación hídrica han llevado a que se propongan medidas estrictas de gestión y control del agua. En este contexto, las estaciones depuradoras de agua residual tienen un papel fundamental en la economía circular del agua y en la eliminación de contaminantes peligrosos para la salud y el medio ambiente.

No obstante, la presencia de algunas sustancias tóxicas puede inhibir los procesos de tratamiento biológico del agua residual y, con ello, afectar negativamente el rendimiento de las EDARs. Por lo tanto, para un correcto funcionamiento de las depuradoras es necesario un control riguroso de estas sustancias, lo que a su vez requiere de nuevas estrategias analíticas que permitan una monitorización más eficiente de los contaminantes. Esto significa proponer metodologías más acordes a las características de los analitos y a la complejidad de las muestras.

Dado que la tendencia actual está dirigida a desarrollar métodos miniaturizados y sostenibles, el desarrollo de sistemas automatizados y portables es de gran interés, debido a que permiten proponer métodos rápidos, precisos, económicos y seguros.

En la presente tesis doctoral se han desarrollado diferentes métodos analíticos para la monitorización de sustancias inhibidoras de los tratamientos biológicos de agua residual. Los métodos propuestos se dividen en sistemas automatizados basados en técnicas de análisis en flujo y en sistemas portátiles que integran dispositivos impresos en 3D.

En los dos primeros trabajos se han desarrollado métodos automatizados de microextracción líquido-líquido dispersiva con agitación magnética asistida en jeringa (*in-syringe*-MSA-DLLME) para la extracción y preconcentración de ácidos grasos volátiles y ácidos grasos de cadena larga. Los métodos propuestos han permitido la inyección de un extracto limpio en el cromatógrafo de gases, evitando los problemas de la inyección acuosa directa. En condiciones optimizadas, los métodos se han aplicado en el análisis de muestras de agua residual y de reactores anaerobios.

En el tercer trabajo se ha puesto a punto un método basado en sensores de papel y un sistema colorimétrico portable impreso en 3D para la determinación de amoníaco y sulfuro en digestores anaerobios y aguas residuales. Los sensores de papel se han impregnado con un indicador azul de bromotimol y con los reactivos del método del azul de metileno para la detección de amoníaco y sulfuro, respectivamente. El procedimiento, basado en la pervaporación y difusión gaseosa en una microplaca, ha permitido el análisis multiparámetro de muestras con matrices complejas. El método propone un análisis colorimétrico rápido de las imágenes capturadas con un teléfono inteligente.

En el cuarto trabajo se ha desarrollado un método para analizar hierro en campo. El método incluye un sistema espectrofotométrico miniaturizado con soportes impresos en 3D y un procedimiento simple para la extracción en fase sólida de hierro. El Fe (III) se ha preconcentrado con una pequeña columna y se ha determinado como Fe (II) con el método de la fenantrolina. El método optimizado se ha aplicado en el análisis de diferentes muestras de agua, incluyendo una muestra de un biodigestor. El método propuesto apuesta por la determinación sensible de hierro en campo sin la necesidad de usar instrumentos costosos.

En el quinto y último trabajo, se propone una plataforma portátil para la extracción *in-situ* de contaminantes fenólicos en muestras de agua residual y de biodigestores. La plataforma integra un agitador impreso en 3D con paletas recubiertas de la red metal-orgánica MIL-100(Fe) para la extracción y preconcentración de los analitos. Las paletas del agitador son removibles y se pueden llevar al laboratorio para el análisis por HPLC-DAD. La plataforma propuesta permite la integración del muestreo y la extracción de los analitos en un solo paso.

# Resum

La creixent sobreexplotació i la contaminació hídrica han fet que es proposin mesures estrictes de gestió i control de l'aigua. En aquest context, les estacions depuradores d'aigua residual tenen un paper fonamental en l'economia circular de l'aigua i en l'eliminació de contaminants perillosos per a la salut i el medi ambient.

Tot i això, la presència d'algunes substàncies tòxiques pot inhibir els processos de tractament biològic de l'aigua residual i, amb això, afectar negativament el rendiment de les EDARs. Per tant, per a un funcionament correcte de les depuradores és necessari un control rigorós d'aquestes substàncies, cosa que alhora requereix noves estratègies analítiques que permetin una monitorització més eficient dels contaminants. Això significa proposar metodologies més d'acord amb les característiques dels analits i la complexitat de les mostres.

Atès que la tendència actual està dirigida a desenvolupar mètodes miniaturitzats i sostenibles, el desenvolupament de sistemes automatitzats i portables és de gran interès, pel fet que permeten proposar mètodes ràpids, precisos, econòmics i segurs.

En aquesta tesi doctoral s'han desenvolupat diferents mètodes analítics per a la monitorització de substàncies inhibidores dels tractaments biològics d'aigua residual. Els mètodes proposats es divideixen en sistemes automatitzats basats en tècniques d'anàlisi en flux i en sistemes portàtils que integren dispositius impresos en 3D.

En els dos primers treballs s'han desenvolupat mètodes automatitzats de microextracció líquid-líquid dispersiva amb agitació magnètica assistida en xeringa (*in-syringe*-MSA-DLLME) per a l'extracció i preconcentració d'àcids grassos volàtils i àcids grassos de cadena llarga. Els mètodes proposats han permès la injecció d'un extracte net al cromatògraf de gasos, evitant els problemes de la injecció aquosa directa. En condicions optimitzades, els mètodes s'han aplicat a l'anàlisi de mostres d'aigua residual i de reactors anaerobis.

Al tercer treball s'ha posat a punt un mètode basat en sensors de paper i un sistema colorimètric portable imprès en 3D per a la determinació d'amoníac i sulfur en digestors anaerobis i aigües residuals. Els sensors de paper han estat impregnats amb un indicador blau de bromotimol i amb els reactius del mètode del blau de metilè per a la detecció d'amoníac i sulfur, respectivament. El procediment, basat en la pervaporació dels analits gasosos en una microplaca, ha permès l'anàlisi multiparamètrica de mostres amb matrius complexes. El mètode proposa una anàlisi colorimètrica ràpida de les imatges capturades amb un telèfon intel·ligent.

Al quart treball s'ha desenvolupat un mètode per analitzar ferro en camp. El mètode inclou un sistema espectrofotomètric miniaturitzat amb suports impresos en 3D i un procediment simple per a l'extracció en fase sòlida de ferro. El Fe (III) s'ha preconcentrat amb una petita columna i s'ha determinat com a Fe (II) amb el mètode de la fenantrolina. El mètode optimitzat s'ha aplicat a l'anàlisi de diferents mostres d'aigua, incloent-hi una mostra d'un biodigestor. El mètode proposat aposta per la determinació sensible de ferro en camp sense la necessitat de fer servir instruments costosos.

Al cinquè i darrer treball, es proposa una plataforma portàtil per a l'extracció *in-situ* de contaminants fenòlics en mostres d'aigua residual i de biodigestors. La plataforma integra un agitador imprès en 3D amb paletes recobertes de la xarxa metall-orgànica MIL-100(Fe) per a l'extracció i preconcentració dels analits. Les paletes de l'agitador són removibles i es poden portar al laboratori per a l'anàlisi per HPLC-DAD. La plataforma proposada permet la integració del mostreig i l'extracció dels analits en un sol pas.

# Abstract

The water growing overexploitation and pollution have led to the proposal of strict water management and control measures. In this context, wastewater treatment plants play a fundamental role in the circular economy of water and in the elimination of pollutants that are dangerous to health and the environment.

However, the presence of some toxic substances can inhibit the biological treatment processes of wastewater and, thus, negatively affect the performance of WWTPs. Therefore, for the correct operation of the treatment plants, a rigorous control of these substances is necessary, which, in turn, requires new analytical strategies that allow a more efficient monitoring of the contaminants. This means proposing methodologies more in line with the characteristics of the analytes and the complexity of the samples.

Since the current trend is aimed at developing miniaturized and sustainable methods, the development of automated and portable systems is of great interest, because they allow to propose fast, precise, economical and safe methods.

In this doctoral thesis, different analytical methods have been developed for the monitoring of inhibitory substances in biological wastewater treatment. The proposed methods are divided into automated systems based on flow analysis techniques and portable systems that integrate 3D-printed devices.

In the first two works, automated methods of dispersive liquid-liquid microextraction with magnetic stirring assisted in a syringe (*in-syringe*-MSA-DLLME) have been developed for the extraction and preconcentration of volatile fatty acids and long-chain fatty acids. The proposed methods have allowed the injection of a clean extract in the gas chromatograph, avoiding the problems of direct aqueous injection. Under optimized conditions, the methods have been applied in the analysis of wastewater samples and anaerobic reactors.

In the third work, a method based on paper sensors and a 3D-printed portable colorimetric system is carried out for the determination of ammonia and sulfide in anaerobic digesters and wastewater. The paper sensors have been impregnated with a bromothymol blue indicator and with the methylene blue method reagents for the detection of ammonia and sulfide, respectively. The procedure, based on the pervaporation of gaseous analytes in a microplate, has allowed the multiparameter analysis of samples with complex matrices. The method proposes a rapid colorimetric analysis of images captured with a smartphone.



In the fourth work a method has been developed to analyze iron in the field. The method includes a miniaturized spectrophotometric system with 3D-printed supports and a simple procedure for solid phase extraction of iron. Fe (III) has been preconcentrated with a small column and determined as Fe (II) with the phenanthroline method. The optimized method has been applied in the analysis of different water samples, including a sample from a biodigester. The proposed method is committed to the sensitive determination of iron in the field without the need to use expensive instruments.

In the fifth and last work, a portable platform for the *in-situ* extraction of phenolic contaminants in wastewater and biodigesters samples is proposed. The platform integrates a 3D-printed stirrer with paddles coated with the metal-organic network MIL-100(Fe) for the extraction and pre-concentration of analytes. The stirrer paddles are removable and can be taken to the laboratory for HPLC-DAD analysis. The proposed platform allows the integration of the sampling and the extraction of the analytes in a single step.

# Listado de publicaciones

La presente tesis doctoral es un compendio de los siguientes artículos de investigación:

- 1. Automated method for volatile fatty acids determination in anaerobic processes using in-syringe magnetic stirring assisted dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography with flame ionization detector**

Autores: M.A. Vargas-Muñoz, Víctor Cerdà, L.S. Cadavid-Rodríguez, Edwin Palacio

Revista: Journal of Chromatography A

Año: 2021

Volumen: 1643

Página: 462034

DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462034

Índice de impacto: 4,601

Cuartil según Journal Citation Reports (JCR): Q1

- 2. Determination of long-chain fatty acids in anaerobic digester supernatant and olive mil wastewater exploiting an in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization-free GC-MS method**

Autores: M.A. Vargas-Muñoz, Víctor Cerdà, Gemma Turnes Palomino, Edwin Palacio

Revista: Analytical and Bioanalytical Chemistry

Año: 2021

Volumen: 413

Páginas: 3833-3845

DOI: 10.1007/s00216-021-03338-z

Índice de impacto: 4,478

Cuartil según JCR: Q2

- 3. Paper sensor-based method using a portable 3D-printed platform and smartphone-assisted colorimetric detection for ammonia and sulfide monitoring in anaerobic digesters and wastewater**

Autores: M.A. Vargas-Muñoz, Julián Morales, Víctor Cerdà, Laura Ferrer, Edwin Palacio

Revista: Microchemical Journal  
Año: 2023  
Volumen: 188  
Página: 108469  
DOI: 10.1016/j.microc.2023.108469  
Índice de impacto: 5,304  
Cuartil según JCR: Q1

**4. Field-deployable method for iron analysis using a simple preconcentration procedure and a 3D portable spectrophotometric system**

Autores: M.A. Vargas-Muñoz, Kaewta Danchana, Víctor Cerdà, Edwin Palacio  
Revista: Microchemical Journal  
Año: 2021  
Volumen: 170  
Página: 106774  
DOI: 10.1016/j.microc.2021.106774  
Índice de impacto: 5,304  
Cuartil según JCR: Q1

**5. A sampling platform incorporating 3D-printed paddles-stirrers coated with metal-organic framework MIL-100(Fe) for in-situ extraction of phenolic pollutants in biodigester supernatant and wastewater effluent samples**

Autores: M.A. Vargas-Muñoz, Carlos Palomino Cabello, Gemma Turnes Palomino, Edwin Palacio  
Revista: Journal of Environmental Chemical Engineering  
Año: 2023  
Volumen: 11(5)  
Página: 110503  
DOI: 10.1016/j.jece.2023.110503  
Índice de impacto: 7,7  
Cuartil según JCR: Q1



---

# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción**

---

## 1.1. Introducción general

La actual sobreexplotación de los recursos hídricos, la escasez de agua en algunas zonas del mundo y las graves consecuencias que la contaminación tiene para el medio ambiente, la salud de las personas y el progreso económico [1], han motivado la transición hacia un modelo de economía circular que aboga por la reutilización del agua. Algo que constituye una herramienta esencial para llevar a cabo el cumplimiento del objetivo 6 de desarrollo sostenible, agua limpia y saneamiento, que busca garantizar la disponibilidad y una gestión eficiente del agua [2].

En este sentido, los gobiernos han establecido normativas para limitar los niveles de descarga de los contaminantes en los cuerpos de agua, a fin de obtener un agua regenerada de calidad (Real Decreto 1620/2007) [3]. Por lo tanto, una medida fundamental para alcanzar una gestión sostenible del agua es controlar el rendimiento de las Estaciones Depuradoras de Agua Residual (EDARs) [4].

Para lograr la eliminación de los contaminantes y la purificación de los efluentes es crucial un adecuado funcionamiento de todas las etapas de depuración (tratamiento primario, secundario y terciario), especialmente del tratamiento secundario o biológico, en el cual ocurre la descomposición de la materia orgánica, y donde se desarrolla principalmente la eliminación de patógenos [5]. Esta es la etapa más vulnerable del proceso de depuración, debido a la presencia de algunas sustancias tóxicas inhibidoras que pueden perjudicar el rendimiento del tratamiento y en el peor de los casos, la interrupción del funcionamiento de la EDAR [6,7].

En las aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas se encuentra una amplia gama de productos como aceites, grasas, detergentes, fármacos, pesticidas y disolventes que derivan en sustancias tóxicas (ácidos, nutrientes, metales pesados, aromáticos, etc.) que pueden afectar a los microorganismos responsables de los procesos biológicos [8,9]. Por esta razón, el control de estas sustancias es clave para mantener unas condiciones químicas que favorezcan el desarrollo microbiológico y así, lograr un tratamiento eficaz.

A fin de mantener la eficiencia del proceso, las EDARs realizan una monitorización y caracterización química de los tratamientos de agua residual [10]. Sin embargo, la presencia de algunas de las sustancias inhibidoras no siempre se evalúa [11], y si se hace, requiere de laboriosos métodos convencionales que consumen tiempo y retrasan la toma de decisiones relacionadas con la depuración y gestión de la planta. Adicionalmente, existen problemáticas analíticas tales como la necesidad del análisis y del transporte de un gran número y volumen de muestras, y la dificultad de la determinación de algunos analitos, usualmente a bajas concentraciones, en muestras con matrices complejas [12,13].

De esta manera, surge la necesidad y el interés de disponer de nuevas estrategias analíticas que permitan una monitorización y control adecuado de los procesos biológicos implicados en el tratamiento de agua residual. Se requiere establecer métodos analíticos de respuesta rápida, eficientes, sensibles, precisos, selectivos y de bajo costo, que además permitan evitar las interferencias matriciales, así como minimizar la contaminación ambiental y la manipulación de sustancias o muestras peligrosas por parte del analista. En consecuencia, existe una tendencia cada vez más alta hacia la miniaturización de las metodologías analíticas, con avances en su automatización y/o portabilidad, con la finalidad de desarrollar procesos más reproducibles, económicos y en sintonía con los objetivos de la química analítica verde [14].

## **1.2. Tratamientos biológicos de aguas residuales**

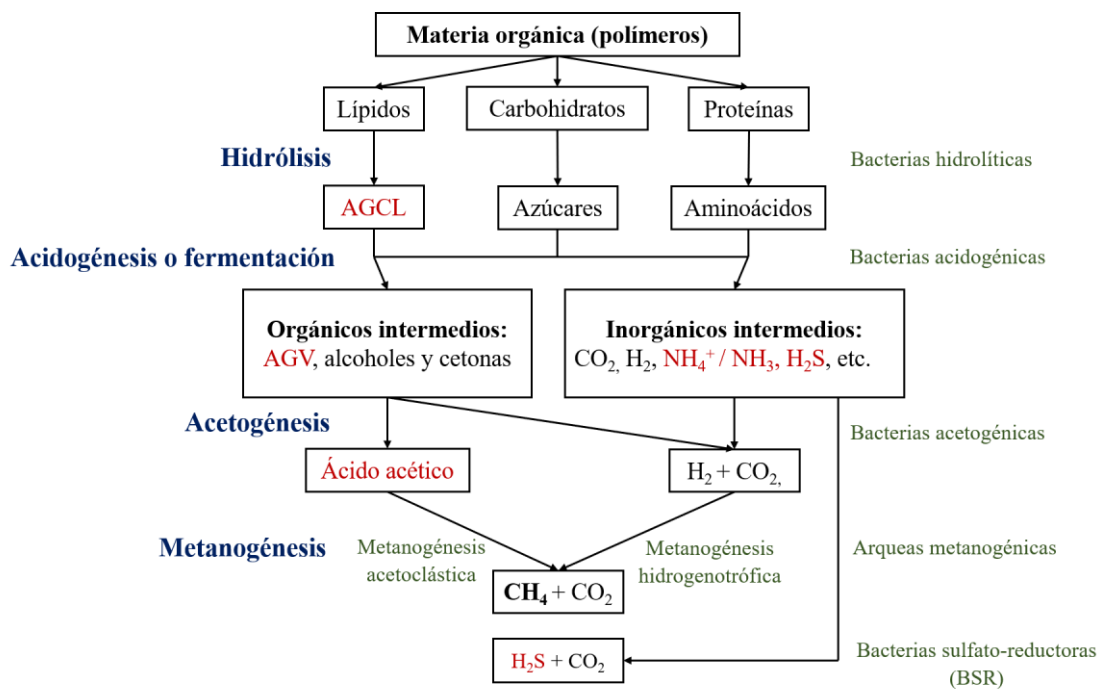
El proceso de tratamiento de aguas residuales se lleva a cabo en tres etapas: (i) el tratamiento primario, que filtra las partículas y desechos grandes; (ii) el tratamiento biológico o secundario, que utiliza procesos biológicos para descomponer la materia orgánica; y finalmente, el tratamiento terciario, donde se realizan los procesos físicos y químicos de filtración y desinfección [15].

Entre estos, el tratamiento biológico consiste en la degradación de la materia orgánica de las aguas residuales, gracias a la aceleración en la proliferación de microorganismos aclimatados, bajo condiciones controladas. Este proceso es vital e indispensable en la depuración, debido a que elimina casi el 60% de los contaminantes del agua [8,15].

Según la disponibilidad de oxígeno, los tratamientos biológicos se clasifican generalmente en procesos aerobios y anaerobios. Por un lado, en los tratamientos aerobios, el aire inyectado mecánicamente permite que las bacterias usen el oxígeno libre, para degradar los contaminantes orgánicos y convertirlos en dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), agua y biomasa. Por otro lado, en los tratamientos anaeróbicos, los microorganismos degradan los compuestos orgánicos en ausencia de oxígeno (y de nitrato) y producen dióxido de carbono, metano ( $\text{CH}_4$ ) y biomasa. Cabe notar, que, en los sistemas anóxicos, la degradación también se desarrolla en ausencia de oxígeno, pero en presencia de nitrato [8,15].

El tratamiento anaerobio de las aguas residuales se lleva a cabo principalmente mediante la digestión anaerobia (DA), un proceso que involucra una serie de reacciones bioquímicas consecutivas y simultáneas en las que los productos de una etapa son utilizados como sustratos para la siguiente. El proceso tiene cuatro reacciones (Figura 1.1): la primera, donde las macromoléculas orgánicas (proteínas, carbohidratos y grasas) se hidrolizan respectivamente en

aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos (principalmente ácidos grasos de cadena larga (AGCL)). La segunda, en la que las bacterias acidogénicas fermentan estos productos y los convierten en ácidos grasos volátiles (AGV), y otros subproductos. La tercera, donde las bacterias acetogénicas generan acetato (ácido acético),  $H_2$  y  $CO_2$ , y la última etapa, en la cual estos productos son finalmente utilizados por las arqueas metanogénicas para producir energía en forma de biogás (típicamente 60 % de  $CH_4$ , 38% de  $CO_2$  y 2% de otros gases). Las instalaciones donde ocurre este proceso reciben el nombre de reactores o biodigestores anaerobios [15,16].



**Figura 1.1.** Esquema representativo de las etapas de la digestión anaerobia. Las sustancias inhibitorias estudiadas en esta tesis y que son generadas por este proceso, se resaltan en rojo.

En comparación con los sistemas aerobios, los reactores anaeróbicos se han convertido en una alternativa atractiva para la estabilización de aguas residuales (i.e. para la reducción y/o eliminación de su carga contaminante antes de su descarga o reutilización), debido a un costo menor de la instalación, una baja producción de lodos, menores requerimientos de energía, mayor biodegradación de compuestos recalcitrantes y una alta producción de biogás [15].

Los procesos aerobios tienen en común con los procesos anaerobios la inhibición por metales y otros compuestos orgánicos [17]. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes del



proceso anaerobio con respecto al tratamiento aerobio es su mayor sensibilidad a estos compuestos tóxicos, y a otros adicionales, producidos por el mismo tratamiento anaeróbico, como los AGV, los AGCL, el amoníaco y el sulfuro de hidrógeno [6,9,18].

Se ha demostrado que la acción tóxica de estos compuestos puede inhibir la actividad microbiana al interrumpir el gradiente de protones y el transporte de electrones a través de la membrana. Además, se puede afectar la síntesis de la pared celular, disminuir la producción de energía celular, inhibir la actividad enzimática y el crecimiento de los microorganismos que participan en el tratamiento biológico.

Estos impactos producen un efecto inmediato en el rendimiento de la EDAR en términos de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO), de nitrógeno y de fósforo, la biodegradación de compuestos tóxicos, la floculación de lodo y la producción de metano [7,17]. Es por esta razón que esta tesis se enfoca principalmente en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de las sustancias inhibitorias presentes en el tratamiento anaerobio.

### **1.3. Sustancias inhibitorias**

Una sustancia tóxica para los microorganismos es aquella que tiene un efecto inhibitorio sobre las funciones vitales para una célula. Dichas sustancias pueden tener fuertes impactos en las reacciones bioquímicas y la actividad de celular relacionada con el metabolismo, el crecimiento, y la respiración celular, y en último lugar, conducir a la muerte celular [17].

Estas sustancias pueden provenir de la corriente de alimentación (afluente de agua residual) o pueden ser los subproductos (productos de transformación) producidos por las actividades metabólicas de los microorganismos que participan en la digestión. Dentro del primer grupo, se incluyen tóxicos inorgánicos como los metales pesados y una gran variedad de contaminantes emergentes (EC) como parte de los tóxicos orgánicos. Dentro del segundo grupo se encuentran los AGV y los AGCL como inhibidores orgánicos, y el amoníaco y el sulfuro de hidrógeno como inhibidores inorgánicos [6,17,18]. Cabe aclarar que las sustancias de este último grupo también pueden llegar desde el afluente residual como resultado de la descomposición natural de la materia orgánica hasta este punto (tratamiento secundario).

Los EC se refieren a aquellas sustancias químicas, que son generadas de manera natural o sintética, que no son comúnmente monitorizadas, pero que pueden suponer un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Las descargas provenientes de industrias, granjas, hospitales, hoteles, hostales, comercios, viviendas, etc., traen consigo una gran cantidad de EC que llegan al

alcantarillado y finalmente a las EDARs. Los EC incluyen diversos productos químicos como pesticidas, herbicidas, antibióticos, medicamentos, productos de cuidado personal, desinfectantes, retardantes de llama, plastificantes, aditivos alimentarios, tensioactivos, metales traza y microplásticos, entre otros. La concentración de estos contaminantes puede variar desde unos pocos  $\text{ng L}^{-1}$  hasta los  $\text{mg L}^{-1}$ , y a concentraciones específicas (reportadas por la literatura y generalmente altas), pueden ser mortales para los microorganismos. Normalmente, la mayoría de plantas depuradoras no tienen la capacidad suficiente para eliminar estos microcontaminantes debido a que suelen aplicar sistemas de tratamiento tradicional (filtración, sedimentación, degradación biológica, radiación UV o cloración) orientados principalmente a la remoción de nutrientes y a la desinfección. La degradación biológica, química y la fotólisis no son suficientes para degradar los EC e incluso pueden tener el efecto contrario, al generar subproductos más tóxicos que el compuesto original. Por ello, los EC pueden ser descargados en el efluente residual y llegar así a los cuerpos de agua más cercanos, causando posibles efectos en el desarrollo de los organismos acuáticos, entre otras consecuencias [17,19].

Para esta tesis se han escogido los fenoles como ejemplo de este último grupo de contaminantes, debido a que su presencia es común en pesticidas, productos farmacéuticos, colorantes y plásticos. Por su parte, se ha elegido el hierro como ejemplo del grupo de metales pesados. También se han desarrollado métodos analíticos para los AGV, los AGCL, el amoníaco y el sulfuro. En esta tesis, la palabra “sulfuro” incluye las formas ionizada y no ionizada del sulfuro de hidrógeno, al menos que se indique lo contrario. En los capítulos 4 al 8 se da una explicación más detallada de cada una de las sustancias inhibidoras que fueron seleccionadas para el desarrollo de esta tesis, incluyendo sus antecedentes analíticos en muestras acuosas.

#### **1.4. Química analítica verde y miniaturización**

La química analítica verde es un enfoque integral que tiene como objetivo el desarrollo de procesos de análisis químico basados en el respeto hacia el medio ambiente, incluyendo la reducción o eliminación de disolventes y reactivos tóxicos, el reemplazo de técnicas dañinas, la biodegradabilidad de sustancias y materiales, la seguridad para el analista y la miniaturización de los pasos de preparación, pretratamiento, separación y determinación [14].

En esa misma línea, el concepto de miniaturización se refiere al desarrollo de procesos analíticos basados en sistemas reducidos, ecológicos y rentables, de modo, que la cantidad de reactivos, disolventes, muestra, residuos, tiempo y energía se reducen drásticamente. Así mismo, pretende la configuración de sistemas rápidos, cerrados y portátiles, que puedan reducir la

descomposición/contaminación de la muestra, la pérdida de los analitos, y la exposición del usuario frente a sustancias y químicos tóxicos o nocivos [20].

En este contexto, gracias al desarrollo de las tecnologías y software, surgen dos grandes estrategias que simplifican la aplicabilidad de las metodologías de análisis, y cumplen con los principios de la química verde y la miniaturización [21]. Por un lado, está la automatización de procesos analíticos mediante el uso de sistemas y técnicas en flujo que reducen tanto el consumo de disolventes, reactivos y muestra, como su manipulación por parte del analista. La automatización aumenta el rendimiento de la muestra y la seguridad laboral, eleva la frecuencia de análisis, y disminuye la generación de residuos y posibles contaminaciones desde o hacia el sistema [22]. Por otro lado, se encuentra el desarrollo de sistemas portátiles que permite un análisis *in-situ*, rápido y sencillo, evitando el transporte de muestras y, por tanto, la pérdida de los analitos y la contaminación durante el muestreo. Estos sistemas tienen un bajo costo y mantenimiento, y suelen contar con un mínimo consumo tanto de energía, como de reactivos y muestra [23].

En esta tesis se describen metodologías alternativas a las tradicionales para la preparación de muestras y la determinación de las sustancias inhibidoras, prestando especial atención a la miniaturización de los sistemas y el cumplimiento de las directrices de la química analítica verde. Dos de los métodos propuestos se basan en la automatización de procesos de microextracción, mientras que los otros tres trabajos se enfocan en el desarrollo de dispositivos portátiles para la extracción o detección rápida de los analitos objetivo. A continuación, se introducen los conceptos más importantes aplicados al desarrollo de las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis.

## **1.5. Técnicas de extracción y preconcentración**

Las muestras de aguas residuales y procedentes del biodigestor contienen matrices complejas y especies interferentes que dificultan el análisis directo de las sustancias de interés y que pueden provocar daños en los equipos. Por esta razón, suele ser necesario un pretratamiento de estas muestras, para facilitar la detección, para eliminar posibles interferentes o para incrementar la concentración del compuesto químico. El pretratamiento de la muestra se puede realizar a través de métodos de extracción mediante la transferencia del analito objetivo desde la muestra acuosa (fase donante) al medio de extracción (fase aceptora). A continuación, se exponen dos de los métodos de extracción más comúnmente utilizados en el análisis químico y que fueron aplicados en los trabajos presentados en esta tesis.

### 1.5.1. Extracción líquido-líquido y microextracción líquido-líquido dispersiva

La extracción líquido-líquido (LLE) es una de las técnicas más empleadas en el pretratamiento de muestras. Se basa en un proceso de separación que consiste en la transferencia de un soluto de una fase líquida a otra fase, también líquida, siendo las dos inmiscibles o parcialmente miscibles entre sí. Normalmente, la extracción comprende un paso de mezcla seguido de un paso de separación de fases; donde una de las fases suele ser agua o una solución acuosa y la otra es un disolvente orgánico (o una mezcla de disolventes) de baja polaridad, llamado también disolvente de extracción o extractante. En términos generales, el disolvente extractante debe tener un bajo punto de ebullición, baja viscosidad y ser compatible con el instrumento de análisis final. Además, la selección de los disolventes con base a su solubilidad es el punto clave en la LLE, ya que de ello depende el reparto de analito entre las dos fases [24].

Los métodos LLE tradicionales consumen altos volúmenes de disolventes orgánicos que son costosos y, en la mayoría de casos, son peligrosos para el medio ambiente y el analista. Además, se trata de procedimientos lentos y complicados, que suelen implicar la evaporación del disolvente y la reconstitución, con el fin de mejorar la extracción. La aparición de técnicas miniaturizadas como la microextracción en fase líquida (LPME) proporcionó un enfoque más seguro y ecológico, y permitió superar estos inconvenientes, ya que disminuía el consumo de reactivos y, por lo tanto, la generación de residuos peligrosos. La LPME implica básicamente la extracción en unos pocos mililitros de fase orgánica, lo cual reduce la cantidad de disolvente y aumenta la preconcentración de los analitos [25,26]. No obstante, sus largos tiempos de equilibrio para la extracción llevaron a que Rezaee y colaboradores desarrollaran en el año 2006 una variante de la LPME, llamada microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [27].

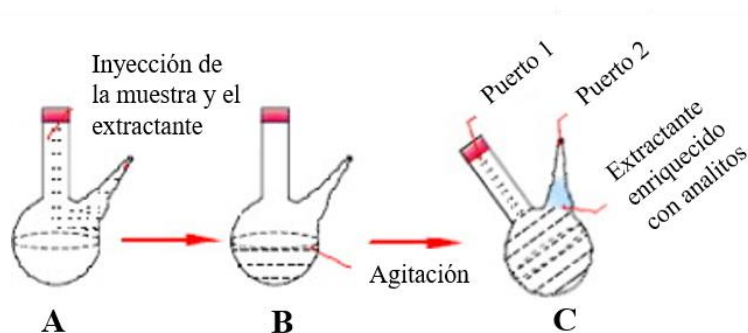
La DLLME se basa en el uso de un sistema de tres componentes, en el que se inyecta un disolvente dispersante (p. ej. metanol, etanol, acetona, acetonitrilo, etc.) junto con el disolvente extractante en la fase acuosa. El dispersante debe ser miscible en ambas fases para inducir la formación de una solución turbia que contiene pequeñas gotas del disolvente extractante dispersas en la muestra acuosa. Este enturbiamiento favorece el contacto entre las fases y acelera la transferencia de masa, lo cual permite alcanzar la estabilización del equilibrio en poco tiempo. La DLLME, además de ser rápida y simple, ofrece una alta eficiencia de extracción y elevados factores de enriquecimiento.

A pesar de estos beneficios, el uso de disolventes dispersivos a veces puede tener el efecto contrario y disminuir la transferencia de analitos, ya que puede complicar la separación de fases y alargar el proceso de centrifugación. El uso de disolventes tóxicos extractivos y de alta densidad como los hidrocarburos halogenados es otra desventaja de esta técnica, debido a que su uso es

muy común para facilitar la separación de la fase extractante sedimentada después de la centrifugación.

Frente a estas problemáticas, se han presentado diferentes alternativas, entre las cuales se encuentran: (i) utilizar disolventes con una densidad inferior a la del agua, (ii) reducir o no usar disolvente dispersante, (iii) no emplear la centrifugación e (iv) incluir tratamientos para mejorar la extracción (microondas, ultrasonido, vórtice, agitación magnética, etc.) [28].

Como ejemplo de este último punto, Zhang y colaboradores, en el año 2011, reemplazaron el disolvente dispersante por la agitación magnética (Figura 1.2), además, usaron un disolvente de baja densidad y realizaron la separación de fases mediante una autoseparación por flotación (con base en las diferencias de densidades), similar a lo que se hace en la LLE convencional. En este método, el pequeño vórtice generado por la energía mecánica permite una emulsificación suave e incrementa la transferencia de analito, debido a una distancia de difusión más corta en comparación con la técnica DLLME clásica. El hecho de no usar un dispersante, hace que este método sea más económico y respetuoso con el medio ambiente [29].



**Figura 1.2.** Esquema representativo del proceso de DLLME-MSA propuesto por Zhang y colaboradores [29]: A) inyección de la muestra y el disolvente extractante (1-octanol), B) agitación magnética, C) separación de la fase orgánica enriquecida con los analitos.

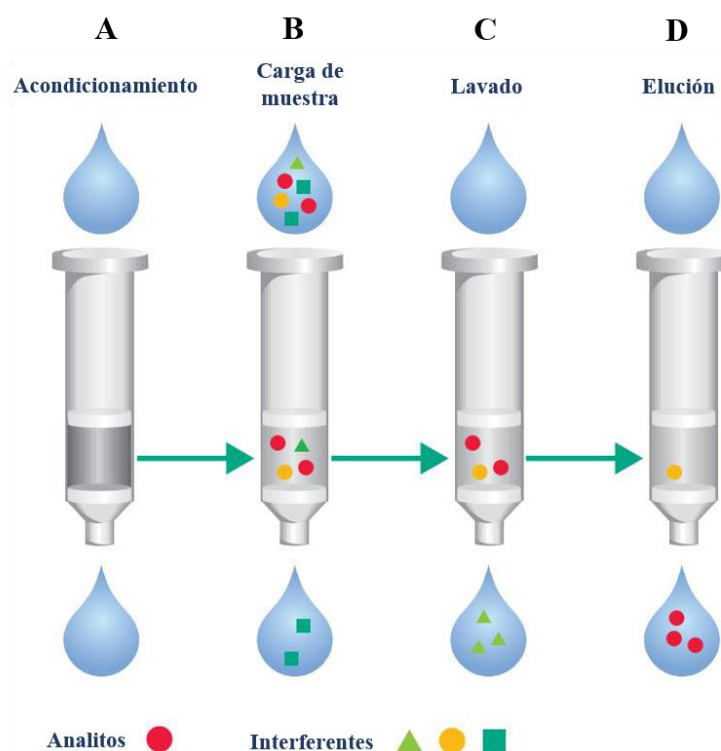
En la literatura, este enfoque recibe el nombre de DLLME asistida con agitación magnética (DLLME-MSA) [29], aunque también se puede denominar microextracción en fase líquida dispersiva (DLPME) [30]. En la presente tesis, se utiliza el término DLLME-MSA. Cabe aclarar que este término también incluye las metodologías donde se usan al mismo tiempo el disolvente dispersante con la agitación magnética. Además, en esta técnica es posible usar disolventes orgánicos, tanto de alta como de baja densidad, dependiendo de la afinidad de los analitos objetivos.

Las ventajas de la DLLME-MSA son claras: es una técnica sencilla, eficiente y cumple con los principios de la química verde. Sin embargo, la aplicación manual de su procedimiento no deja de ser lenta, laboriosa y poco precisa, debido principalmente al manejo de un gran número de muestras y bajos volúmenes de extractante. Por lo tanto, las técnicas de análisis en flujo son una opción adecuada para solventar algunos de estos inconvenientes, tal como se mostrará más adelante. En el capítulo 4 y 5 de esta tesis se describe una aplicación de la DLLME-MSA en distintas formas.

### **1.5.2. Extracción en fase sólida**

Actualmente, la extracción en fase sólida (SPE), que incluye el aislamiento, enriquecimiento y purificación de los componentes, es la técnica más empleada para el pretratamiento de muestras líquidas.

El principio de SPE es similar al de la LLE, ya que implica un reparto de los analitos con base en su afinidad por una de las fases. El procedimiento típico de la SPE consiste en pasar una solución o una muestra a través de una fase sólida (previamente acondicionada) capaz de retener algunos compuestos, entre los cuales se encuentran los analitos objetivo. Posteriormente, se eliminan por lavado los compuestos no deseados y se eluyen los analitos de interés con un disolvente adecuado en un recipiente recolector [31]. En la Figura 1.3 se muestran los pasos básicos del procedimiento SPE.



**Figura 1.3.** Esquema representativo de los pasos básicos del procedimiento SPE: A) acondicionamiento de la columna, B) carga de la muestra, C) lavado, D) elución de los analitos [32].

Una de las principales ventajas de la SPE frente a la LLE es la capacidad de almacenar por cierto tiempo los analitos adsorbidos en la fase sólida sin que se descompongan o cambien su concentración e identidad. Otra ventaja de la SPE es que es más selectiva en la extracción de una gran variedad de analitos. Por el contrario, la LLE destaca sobre la SPE por una mayor estabilidad de su fase de extracción y porque evita los efectos memoria de las fases estacionarias [25]. En la literatura, se atribuyen otras ventajas a SPE, como la reducción: de tiempo, costos, consumo de reactivos, producción de residuos y exposición del analista a compuestos químicos. Sin embargo, éstas últimas son discutibles, ya que dependerá del tipo de método propuesto y de la concentración del analito [33].

Existen una amplia gama de formatos y materiales para su aplicación en SPE. La elección del tipo de fase sólida y eluyente dependerá de la polaridad, el estado iónico y otras propiedades químicas de los analitos. Por un lado, se encuentran los sorbentes comerciales, empaquetados en cartuchos o columnas, como p.ej. la resina de intercambio iónico Chelex-100 (copolímero de estireno-divinilbenceno que contiene grupos de iminodiacetato) usada en el capítulo 7. Mientras que, por otro lado, existen nuevos materiales que pueden ser usados como adsorbentes, como, por ejemplo, los polímeros impresos molecularmente, los materiales magnéticos, aquellos a base de

carbono [31] o las redes metal-orgánicas (MOF) [34]. Este último tipo de materiales fue usado en el capítulo 8 de esta tesis y por ello, a continuación, se hace una breve descripción de los mismos.

#### 1.5.2.1. Redes metal-orgánicas

Las redes metal-orgánicas o MOF (*metal-organic frameworks*) son una clase de materiales porosos formados por la unión entre centros metálicos (también conocidos como unidades de construcción secundaria o SBU) y ligandos orgánicos. Los MOF incluyen una gran variedad de compuestos que se suelen clasificar en función de su morfología y/o el lugar donde fueron desarrollados por primera vez. Además, se pueden sintetizar de numerosas formas, entre las cuales se incluyen la síntesis solvotermal, electroquímica, mecanoquímica, asistida por microondas y por ultrasonido [36]. Una característica importante de los MOF es que poseen estructuras y composiciones ajustables, destacando entre sus propiedades su alta porosidad y elevada área superficial. La versatilidad de este tipo de materiales permite su aplicación en una gran variedad de campos como la catálisis, la biomedicina, la electroquímica, el almacenamiento de gases y la adsorción de contaminantes, entre otros [35]. En el capítulo 8 de esta tesis se ha utilizado como adsorbente el MOF MIL-100(Fe), un material que fue sintetizado por primera vez por el Instituto Lavoisier. El MIL-100(Fe) es un sólido mesoporoso basado en la unión de trímeros de octaedros  $\text{FeO}_6$  conectados mediante ligandos trimesato, y que se caracteriza por su alta porosidad, baja toxicidad y, elevada estabilidad térmica ( $> 270\text{ }^\circ\text{C}$ ) y química (al agua y a disolventes orgánicos). Además, se puede obtener mediante síntesis asistida por microondas, un método rápido que se caracteriza por tener una alta velocidad de calentamiento y tiempos de reacción cortos [36,37].

### 1.6. Técnicas de análisis en flujo

Las técnicas de análisis en flujo han permitido automatizar total o parcialmente los procesos analíticos llevados a cabo en un laboratorio, ya sea el análisis completo o solamente una etapa específica del mismo, como p.ej. el tratamiento de muestra, que es la etapa más larga y crítica del análisis químico.

Las ventajas que ofrecen estos sistemas consisten en una reducción del volumen de muestra, un menor consumo de disolventes, y, por lo tanto, una menor generación de residuos peligrosos, y un ahorro de costes. Así mismo, se minimiza la manipulación de sustancias y muestras peligrosas y, por tanto, la exposición del analista a las mismas, evitando también la contaminación de las muestras. Además, se aumenta la eficiencia de los procesos, debido a que se incrementa la frecuencia de análisis y se obtienen resultados más precisos y reproducibles que con los métodos



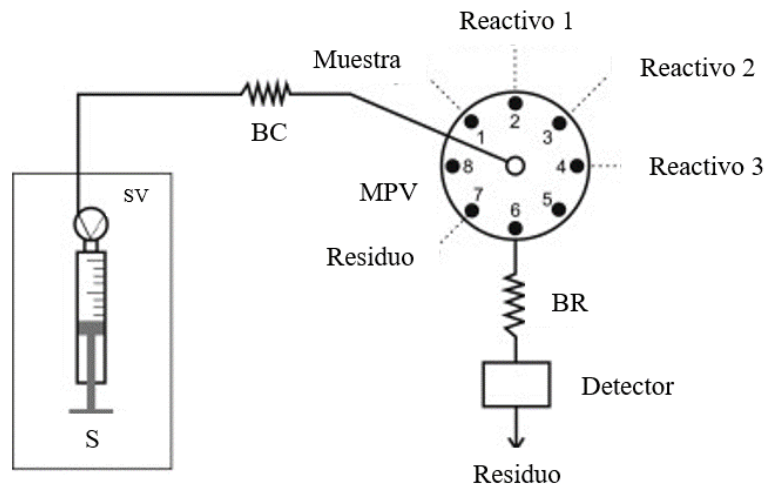
convencionales y manuales. Por esta razón, las técnicas de análisis en flujo resultan beneficiosas tanto para investigación como para el análisis de rutina en laboratorios.

Puesto que existen numerosas publicaciones sobre los orígenes de las técnicas en flujo [38,39], a continuación, se explicará brevemente solo las técnicas usadas en este trabajo.

### **1.6.1. Análisis por inyección secuencial**

El análisis por inyección secuencial (SIA) fue desarrollado por J. Ruzicka y G. Marshal en 1990 [40]. Esta técnica consiste en usar una bomba pistón bidireccional con una jeringa unida a una válvula solenoide (SV) de tres vías, que permite el movimiento de los fluidos. La jeringa (S) se conecta con el puerto central de una válvula de selección o de multiposición (MPV), normalmente a través de un bucle de carga. La válvula de selección tiene sus puertos laterales enlazados a los recipientes de reactivos, muestra, detector, residuos u otros dispositivos (Figura 1.4). Gracias al control por medio de ordenadores es posible conectar el puerto central con uno de los puertos laterales y dar instrucciones de aspirar o dispensar un volumen determinado de líquido al caudal deseado.

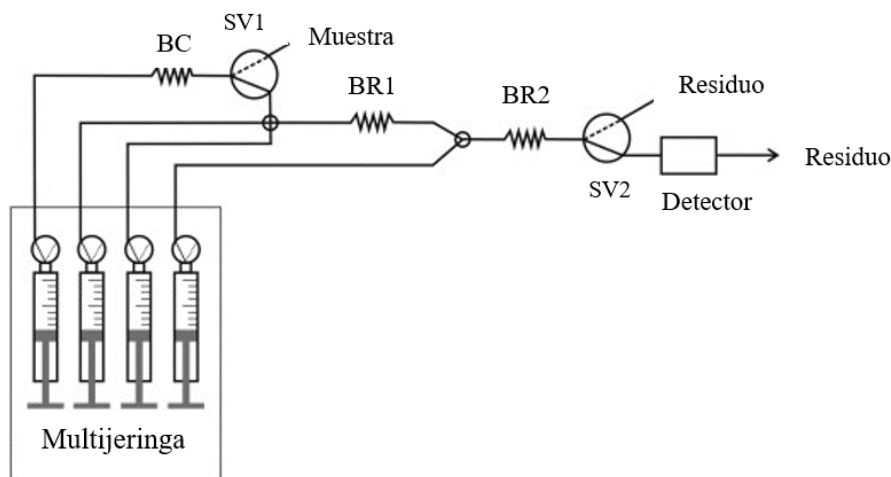
El SIA es una técnica más robusta y versátil que sus antecesoras, el SFA (análisis en flujo segmentado) y el FIA (análisis por inyección en flujo). El flujo en SIA no es continuo y, por lo tanto, contribuye al ahorro de muestra y reactivos. Además, el control por ordenador evita que se altere la configuración del *manifold* (sistema de tuberías) cuando se desea cambiar el método. Por otro lado, el SIA usa jeringas de vidrio y conexiones de teflón que son químicamente más resistentes a ácidos, bases y disolventes. En cuanto a las desventajas del SIA, el uso de ordenadores y un sistema más complejo, incrementa los costos y minoriza la frecuencia de análisis en comparación, por ejemplo, con el FIA [38,39].



**Figura 1.4.** Esquema representativo del *manifold* de un sistema SIA. S: jeringa, BC: bucle de carga, SV: válvula solenoide, MPV: válvula de multiposición, BR: bucle de reacción [38].

### 1.6.2. Análisis por inyección en flujo multijeringa

El análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) fue desarrollado en 1999 por el grupo de Química Analítica Ambiental de la Universitat de les Illes Balears en colaboración con la compañía Crison (Alella, Barcelona, España) [41]. El MSFIA surgió con la intención de combinar las ventajas de los métodos FIA, SIA y el análisis en flujo multiconmutado (MCFIA) y se basa en el uso de una bureta automática que puede estar compuesta de hasta cuatro jeringas. El motor mueve, paso a paso y de forma simultánea, los pistones de las jeringas que están sujetos a una barra metálica, lo cual equivale al modo multicanal con bombas peristálticas que utiliza el FIA, pero sin sus frágiles tubos. Además, la válvula solenoide puesta sobre la cabeza de cada jeringa permite una conmutación rápida similar a la técnica MCFIA. Por lo tanto, el sistema MSFIA mejora el rendimiento de mezcla de reactivos y muestra con respecto al SIA y, por consiguiente, se obtiene una elevada frecuencia de análisis similar a la técnica FIA. También, se consigue la versatilidad, la robustez y el bajo consumo de líquidos del SIA, ya que el ordenador controla todo el sistema, se usan jeringas de vidrio y teflón, y se utiliza solamente la cantidad necesaria de muestra y reactivos. En la Figura 1.5 se muestra un esquema del *manifold* típicamente usado en MSFIA. En el capítulo 3 se describen detalladamente los componentes del sistema MSFIA [38,39].



**Figura 1.5.** Esquema representativo del *manifold* de un sistema MSFIA. BC: bucle de espera, SV1/SV2: válvula solenoide, BR: bucle de reacción [38].

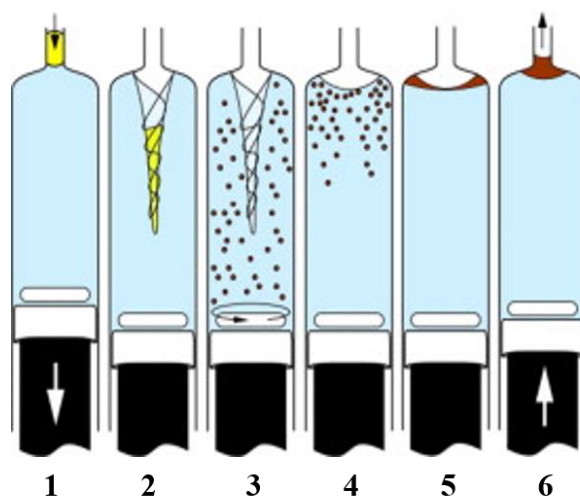
### 1.6.3. Laboratorio en jeringa (*lab-in-syringe*) y microextracción líquido-líquido dispersiva en jeringa (*in-syringe-DLLME*)

La automatización de la técnica DLLME aumenta la reproducibilidad de su aplicación, ya que permite manejar volúmenes pequeños con mayor precisión en un sistema cerrado. La DLLME automatizada comenzó inicialmente con enfoques basados en flujo (*flow*), donde la dispersión del extractante junto con el dispersante se realizaba dentro de la tubería. El primer trabajo de DLLME en flujo corresponde a Anthemidis y Ioannou (2009) [42], quienes utilizaron un SIA para el enriquecimiento de cobre y plomo. Posteriormente, aparecieron los enfoques de DLLME basados en lotes (*batch*), donde se utilizaba viales como cámaras de mezcla (con un agitador magnético) y un muestreador automático con la punta de una jeringa para la succión de la gota orgánica. Luego, esto abrió paso a los enfoques basados en flujo por lotes (*flow-batch*), una técnica que combina el sistema de lotes y la automatización en flujo, en la cual se conectaba directamente el tanque de mezcla con una válvula de selección y/o el *manifold*. Más recientemente, este trabajo dio lugar a la técnica de laboratorio en jeringa (*lab-in-syringe*, LIS) con la DLLME en jeringa (*in-syringe-DLLME*). Una técnica híbrida entre el SIA y la técnica *flow-batch*, que consiste básicamente en usar el espacio vacío de la jeringa como un cámara de extracción sellada, similar a los tanques de mezcla usados en el enfoque de flujo por lotes [43].

Maya y colaboradores en el año 2012 [44] utilizaron por primera vez una jeringa para la automatización de DLLME. Un año después, Horstkotte y colaboradores [45] mejoraron la dispersión de la mezcla de disolventes con la muestra, usando una barra de agitación magnética

dentro de la jeringa para realizar por primera vez la DLLME con agitación magnética asistida (MSA) (Figura 1.6). Desde entonces, los sistemas de DLLME en jeringa han seguido usándose en numerosos trabajos para la preparación de la muestra [46]. Como se observará más adelante, la aplicación de esta técnica ha sido empleada en los capítulos 4 y 5 de esta tesis.

En cuanto a los pros y contras de la técnica, en la *in-syringe*-DLLME se pueden usar velocidades de agitación mucho más rápidas que en cámaras de mezcla abiertas, lo que aumenta la eficiencia de extracción. Además, se pueden mezclar volúmenes de líquido más grandes en comparación con los enfoques basados en flujo. También, se pueden usar disolventes de mayor y menor densidad que el agua, gracias a la posibilidad de usar la jeringa en una posición invertida. Sin embargo, la principal desventaja es el gran volumen muerto de la jeringa que requiere limpieza entre cada análisis, lo cual ralentiza el procedimiento comparado con el enfoque basado en flujo [43].



**Figura 1.6.** Esquema representativo de la DLLME-MSA. (1) carga de un disolvente extractante menos denso que el agua en la jeringa, (2) carga de un disolvente dispersante, (3) mezcla de los disolventes con la muestra mediante agitación magnética y dispersión del disolvente en pequeñas gotas, (4) la agitación magnética se detiene y las gotas de la fase orgánica flotan hacia la superficie, (5) coalescencia de las gotas de la fase orgánica durante la separación de fases, (6) la gota orgánica se dispensa hacia arriba. La muestra se recolecta en un vial con el fin de analizarla. Alternativamente, puede ser enviada a otra parte del sistema automático o al instrumento de análisis y/o detección correspondiente [45].

## 1.7. Tecnología de impresión 3D

La fabricación aditiva (*additive manufacturing* - AM), mejor conocida como impresión 3D, es una tecnología de impresión, que construye objetos físicos a partir de datos digitales tridimensionales de un modelo de diseño asistido por computadora (CAD) y mediante la adición de materiales capa por capa. El procedimiento general para la impresión 3D consiste en utilizar, en primer lugar, un software CAD para crear la estructura del modelo geométrico. A continuación, el archivo CAD se convierte al formato estándar STL (malla de triangulación), para, finalmente, enviar el archivo STL a la impresora responsable de la fabricación de la pieza 3D. Los materiales tradicionalmente usados para la impresión son termoplásticos, aunque también se utilizan otros como metales, vidrio, grafeno y cerámica [47].

La AM se ha convertido en una tecnología de amplia aplicación en muy distintos campos como en la medicina, la química, la biología, la arquitectura, el arte, la educación y la mercadotecnia, entre otros. De manera específica, la impresión 3D se ha utilizado en química analítica para el diseño de piezas auxiliares en sistemas analíticos. Estos abarcan desde dispositivos de extracción y preconcentración, a plataformas microfluídicas, aparatos electroquímicos, cromatográficos, espectroscópicos o sensores portátiles, entre otros [48,49].

La impresión 3D destaca por su simplicidad, flexibilidad, rapidez y bajo costo de fabricación, con un mínimo uso del espacio y poco gasto energético. Además, permite la personalización de productos y la impresión de prototipos con diseños complejos. Con respecto a la fabricación sustractiva (fresado, taladrado, cortado, etc.), la fabricación aditiva posee las ventajas de imprimir simultáneamente varias piezas con un elevado grado de detalle y la posibilidad de compartir los diseños de impresión.

En la actualidad, se utilizan diferentes tipos de técnicas para la impresión 3D: estereolitografía (SLA), modelado por deposición fundida (FDM), sinterización selectiva por láser (SLS), la fabricación de objetos laminados (LOM) o la impresión Polyjet, entre otras [48]. A continuación, se explican con más detalle las modalidades usadas en esta tesis.

### 1.7.1. Estereolitografía

La técnica de estereolitografía (SLA) fue propuesta en 1970 por Hideo Kodama y posteriormente fue patentada por Charles W. Hull en 1986 [50]. La SLA permite imprimir piezas 3D capa por capa a partir de la fotopolimerización, un proceso donde se utiliza una fuente de luz (láser o proyector) para calentar la superficie superior de una resina líquida que contiene polímeros

fotocurables que instantáneamente se endurecen ante la acción de la luz. Las piezas 3D así obtenidas suelen requerir de un curado posterior con luz ultravioleta (UV) para lograr una mayor resistencia y estabilidad [47,48].

A gran escala, el sistema consta de un tanque donde se almacena el polímero líquido, una plataforma móvil y una fuente de luz. La diferente disposición de estos componentes da lugar a dos tipos de impresoras SLA: las máquinas de lado derecho hacia arriba (*right-side-up*) y las máquinas invertidas (*upside-down*) [47,51]. Como la impresora SLA utilizada en esta tesis fue de este último tipo, en la Figura 1.7 se describe brevemente su funcionamiento.



### SLA invertida

- 1 Pieza impresa
- 2 Soportes
- 3 Resina
- 4 Plataforma de construcción
- 5 Láser
- 6 Galvanómetros
- 7 Espejo de escaneo X-Y
- 8 Rayo láser
- 9 Tanque de resina

**Figura 1.7.** Esquema representativo de la estereolitografía invertida. Esta configuración emplea un tanque transparente y antiadherente para almacenar la resina líquida curable y una plataforma de construcción vertical que baja hacia el fondo del tanque, para empezar la impresión de las capas hacia arriba. En la parte inferior de la máquina se encuentra un láser UV que apunta a dos galvanómetros de espejo. Luego, esta luz se dirige a otro espejo que dirige la luz hacia arriba, al fondo del tanque, para curar la resina. Entre cada capa, la pieza se separa del tanque, permitiendo que la resina fluya de nuevo a su lugar [51,52].

La tecnología SLA tiene las ventajas de poder usar una gran variedad de materiales, imprimir objetos con gran nitidez y con un acabado de superficie liso, favoreciendo su impermeabilización. Su principal desventaja es la altura de impresión del producto, que está limitada por la altura entre la cubeta de resina y la plataforma de construcción [48,52].

### 1.7.2. Modelado por deposición fundida

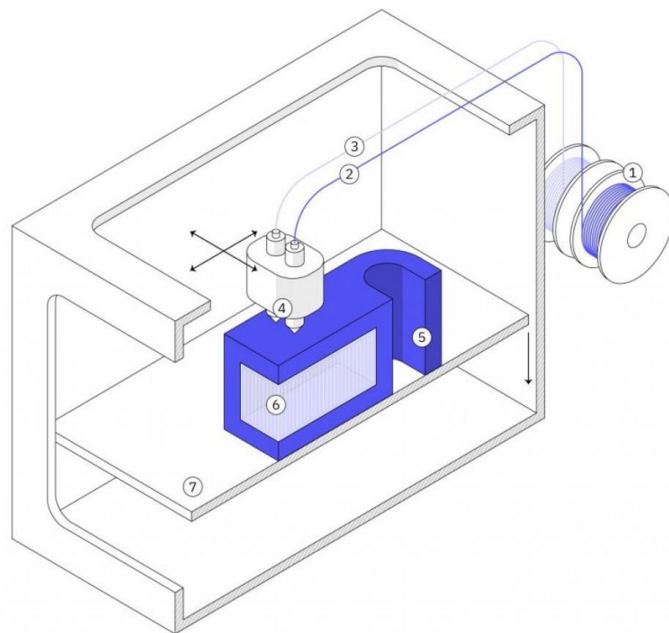
El modelado por deposición fundida (FDM) fue introducido por primera vez por Scott Crump en 1986 y patentado por él mismo en 1989. Esta técnica consiste en calentar hasta fundir el material de un filamento termoplástico y, luego, realizar la extrusión en capas consecutivas hasta formar el objeto 3D [47,48].

Una impresora por FDM presenta dos sistemas: uno responsable de la extrusión y deposición del material, y el otro encargado del movimiento del cabezal de impresión. A su vez, el sistema de extrusión y deposición se divide en dos conjuntos: un extremo frío y un extremo caliente. El material de partida para la impresión suele venir en bobinas de filamento sólido, y el extremo frío, es el responsable de alimentar este material desde la bobina de impresión. El extremo caliente es el cabezal de impresión, que está encargado de calentar el material plástico hasta extruirlo por una boquilla y que se mueve para depositar el material fundido en consecuencia. Una vez el material es depositado, se enfría y solidifica sin ningún postratamiento adicional. En la Figura 1.8 se esquematizan los componentes de la impresión FDM [53,54].

A diferencia de la tecnología SLA, la impresión FDM es más económica y simple. Esta modalidad tiene además la posibilidad de imprimir piezas más grandes y con distintos materiales simultáneamente. Sin embargo, la impresión FDM tiene una más baja precisión y resolución de impresión (0,2 mm) respecto a la SLA (0,025 mm), y requiere de un mayor mantenimiento y calibración de sus componentes [48,53].

#### FDM

- ① Carretes de filamento
- ② Filamento principal
- ③ Soporte del filamento
- ④ Cabeza de extrusión
- ⑤ Pieza impresa
- ⑥ Soporte de la estructura
- ⑦ Plataforma de construcción



**Figura 1.8.** Esquema representativo de una impresora de modelado por deposición fundida [54].

## 1.8. Dispositivos analíticos basados en papel

Los sensores basados en papel, también conocidos como dispositivos analíticos basados en papel (PAD), representan una tecnología alternativa a la instrumentación de análisis tradicional. Fueron introducidos por primera vez en 2007 por Whitesides y colaboradores [55]. Desde entonces, esta metodología ha crecido exponencialmente y se ha convertido en una herramienta valiosa para distintas aplicaciones, incluido el diagnóstico médico, la monitorización ambiental y el análisis de alimentos. Los PAD son plataformas de testeo portátiles, desechables, económicas y simples de fabricar/operar. También, son útiles para obtener información rápida de determinados parámetros y para realizar la monitorización en campo, especialmente en zonas remotas, de bajos ingresos o con poca infraestructura y personal no capacitado [56–58].

El uso de papel como sustrato tiene la ventaja de ser asequible, liviano, flexible, biodegradable y de bajo costo. El papel compuesto de fibras de celulosa es un candidato ideal para el análisis químico debido a su biocompatibilidad natural con las muestras ambientales. Su estructura fibrosa y porosa, así como su inercia (química y biológica) permiten inmovilizar con gran facilidad los reactivos dentro del papel. Además, posibilita la filtración y absorción de la muestra gracias a su estructura de red, su alta relación superficie-volumen y su capacidad de transportar los líquidos por acción capilar, sin necesidad de una fuerza adicional [57].

La fabricación de PAD se basa generalmente en el uso de barreras hidrofóbicas o físicas utilizando diferentes métodos, como el corte, fotolitografía, impresión con cera o tinta. El papel de filtro es el tipo de papel más utilizado para los sensores basados en papel. Los papeles de filtro de la gama celulosa de Whatman® son los más populares debido a su bajo costo, ubicuidad y alta capacidad de absorción. Estos filtros varían según sus propiedades físicas, que incluyen porosidad, grosor y velocidad de absorción. Comúnmente, se utiliza el papel Whatman No.1, un filtro de calidad estándar, con retención y velocidades de flujo medias debido a su grosor de 180  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 11  $\mu\text{m}$ . También, se han utilizado otros tipos de papel filtro, como el papel de filtro Whatman No. 4, debido a su mayor tamaño de poro (20-25  $\mu\text{m}$ ) y mayor tasa de absorción. En el capítulo 6 se utilizan ambos tipos de papel de filtro Whatman y se emplea el método de corte para la fabricación de los sensores [57,59].

Los métodos de detección utilizados para los PAD incluyen la detección colorimétrica, luminiscente, electroquímica y fotoelectroquímica. Entre ellas, una de las más utilizadas es la detección colorimétrica debido a su simplicidad y compatibilidad con sistemas analíticos portables y de bajo costo. Además, el papel proporciona un fondo blanco incoloro y de alto contraste ideal para las lecturas colorimétricas [57]. Esta es la modalidad de detección usada en el capítulo 6 de esta tesis por lo que, a continuación, se incluye una introducción a la misma.



### 1.8.1. Colorimetría de imágenes digitales

La colorimetría es la ciencia y tecnología usada para describir o cuantificar la percepción humana del color. La detección colorimétrica suele estar relacionada con una reacción química que produce el cambio de color, en la que el análisis de los resultados puede evaluarse de forma cualitativa, por comparación visual (respuesta sí/no), o de forma cuantitativa, midiendo las propiedades del color. La colorimetría cuantitativa que incluye la colorimetría fotoeléctrica (colorímetros y espectrofotómetros), reflectométrica y digital, tiene mayor precisión que la colorimetría visual, en la que los cambios de color sutiles son difíciles de apreciar a simple vista.

La colorimetría de imágenes digitales (DIC) hace referencia al método de análisis colorimétrico basado en fotografías o escaneos digitales. Las herramientas de adquisición de datos colorimétricos incluyen cámaras digitales, cámaras web, teléfonos móviles, escáneres portátiles y de escritorio. Entre estos dispositivos, los teléfonos inteligentes son los preferidos en la actualidad debido a su ligereza, portabilidad, popularidad, gran capacidad de almacenamiento, alta velocidad de procesamiento, mejora notable de las características de la cámara y elevada calidad de las imágenes.

Cuando se capturan las imágenes con los teléfonos inteligentes, el color se puede ver influenciado por la iluminación ambiental, y, por lo tanto, es necesario controlar las condiciones de iluminación y captura de las imágenes, como la homogeneidad/intensidad de la luz, la geometría de emisión, y la distancia entre la cámara y la zona de detección. La estabilidad de dichas condiciones es esencial para obtener resultados fiables y robustos. Además, en cuanto a la cámara del teléfono móvil, el usuario puede optimizar la captura de las imágenes controlando parámetros de la cámara como la intensidad, brillo, filtros, etc.

Las imágenes digitales se pueden descomponer en escala de grises o en tres componentes del espacio de color (modelos de color): RGB (rojo, verde, azul), CMYK (cian, magenta, amarillo, clave (negro)) o HSV (tono, saturación, valor). Las imágenes se procesan mediante programas de análisis del color, como Adobe Photoshop, ChemoStat, Matlab, Pantone Studio o ImageJ, y se utilizan para la cuantificación de la intensidad de color, como respuesta analítica. Comúnmente, la intensidad de color ( $I$ ) de uno de los componentes (p.ej. R – rojo) se transforma en valores de absorbancia, como:  $A = \log\left(\frac{I_{Blanco}}{I_{muestra}}\right)$ , y después, se representa gráficamente frente a la concentración conocida, para obtener curvas de calibración linealizadas.

Dado que la zona de detección del PAD puede estar coloreada de forma desigual, el usuario debe decidir si medir toda la zona o solo una parte de ella. No obstante, posibles errores atribuidos a esta variabilidad de color se pueden evitar si se realizan más réplicas y se eliminan

correctamente los datos atípicos. Si bien la DIC no puede competir con la precisión de las técnicas espectrofotométricas que miden la absorbancia en el punto óptimo de la máxima longitud de onda para el analito, un tratamiento cuidadoso de las imágenes digitales puede conducir a resultados gratamente sensibles y reproducibles [57,60].

En el capítulo 6 de esta tesis se lleva a cabo la adquisición de imágenes digitales con un teléfono inteligente y se ha utilizado el modelo RGB para la cuantificación colorimétrica. Para la medición de las intensidades de color se ha utilizado el programa ImageJ, que se explica con más detalle en la sección de materiales y métodos.



---

# **CAPÍTULO 2**

## **Objetivos**

---

## 2.1. Objetivo general

Desarrollar nuevos métodos analíticos rápidos, sensibles, selectivos y precisos, basados en sistemas automatizados o portables que integren dispositivos, preparados mediante técnicas de fabricación avanzada, para permitir la monitorización de sustancias inhibidoras de procesos biológicos de tratamientos de aguas residuales.

## 2.2. Objetivos específicos

- I. Desarrollar un método automatizado de microextracción líquido-líquido dispersiva en jeringa previo al análisis por GC-FID para la determinación de ácidos grasos volátiles en agua residual y procesos anaerobios.
- II. Desarrollar un sistema automatizado de microextracción líquido-líquido dispersiva en jeringa y un método GC-MS sin derivatización para la determinación de ácidos grasos de cadena larga en digestores anaerobios y aguas residuales de almazara.
- III. Desarrollar un método de extracción en fase sólida y un sistema espectrofotométrico portable impreso en 3D para la preconcentración y análisis de hierro en diferentes tipos de muestras de agua.
- IV. Desarrollar un método basado en sensores de papel y un sistema colorimétrico portable impreso en 3D para la detección de amoníaco y sulfuro en digestores anaerobios y aguas residuales.
- V. Desarrollar un agitador portable impreso en 3D con paletas recubiertas de una red metal-orgánica para la extracción en fase sólida *in-situ* de compuestos fenólicos en biodigestores y agua residual.



---

# **CAPÍTULO 3**

## **Materiales y métodos**

---

### 3.1. Instrumentación de los sistemas de análisis en flujo

Las técnicas de análisis en flujo que se han utilizado en esta tesis son el SIA y el MSFIA, la primera, usada en el trabajo del capítulo 4 y la segunda, usada en el trabajo del capítulo 5. En ambos casos también se ha empleado la técnica *in-syringe*-DLLME. En su conjunto, estas técnicas permitieron desarrollar sistemas automatizados para la DLLME de los dos grupos de ácidos grasos analizados (AGV y AGCL). Para ello, fue necesario conectar en serie a un ordenador, a través de una interfaz serial RS232C, instrumentos como una multijeringa, un módulo de válvulas y un muestreador automático, todos ellos controlados mediante el programa informático de AutoAnalysis 5.0 [39]. A continuación, se da una descripción más detallada del programa y los instrumentos utilizados.

#### 3.1.1. Módulo multijeringa

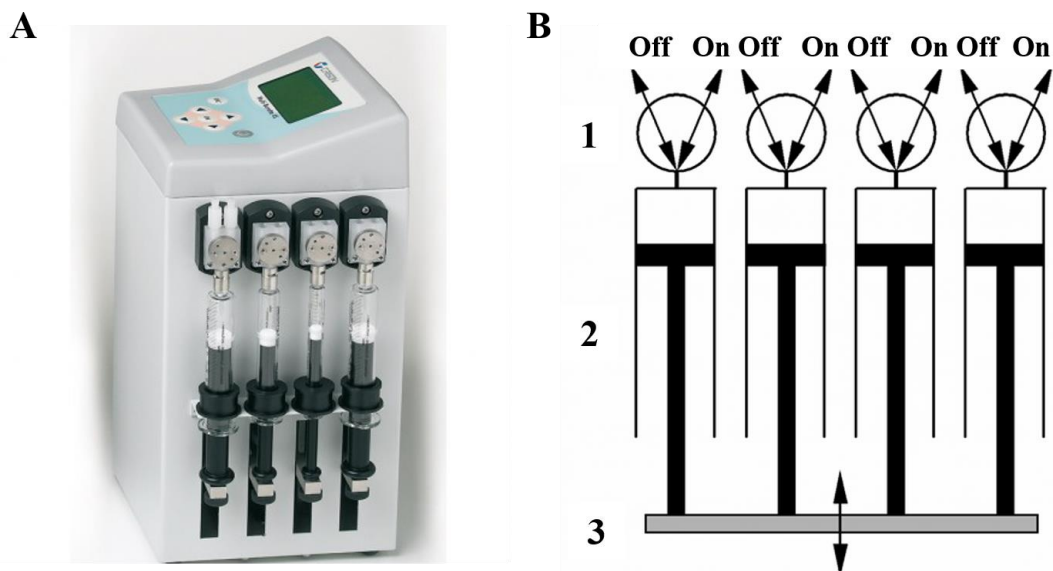
El módulo o bureta multijeringa (MSM) (BU 4S, Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España) es el instrumento principal de la técnica MSFIA [61], debido a que se puede equipar hasta con cuatro jeringas (Figura 3.1A). Si se emplea una única jeringa, este mismo módulo también puede ser usado para la técnica SIA. En el sistema propuesto en el capítulo 4 se ha usado una sola jeringa de 5 mL, mientras que en el capítulo 5 se utilizaron dos jeringas, una de 5 mL y otra de 10 mL.

En este instrumento, las jeringas de vidrio (Hamilton, Suiza) son impulsadas con un émbolo de aluminio que tiene en su cabeza un pistón de politetrafluoroetileno (PTFE). Cada émbolo se ajusta con tornillos a una barra de acero horizontal que es desplazada por un motor paso a paso (5000, 16000 o 40000 pasos, según el modelo de la bureta), permitiendo un movimiento unidireccional, preciso y simultáneo de las jeringas. El émbolo de la jeringa sube para dispensar (*dispense*) o baja para aspirar (*pick-up*) los líquidos a un caudal programable, que va desde los  $\mu\text{L min}^{-1}$  hasta los  $\text{mL min}^{-1}$  dependiendo del volumen de la jeringa y del número de pasos. En los dos trabajos incluidos en esta tesis (capítulos 4 y 5) se empleó una multijeringa de 16000 pasos, alcanzando una resolución de 0,3 a 0,6  $\mu\text{L}$  para jeringas de 5 y 10 mL, respectivamente.

En la cabeza de cada jeringa se aloja una válvula solenoide de tres vías (N-Research, Caldwell, NJ, USA) que permite una conmutación múltiple (35 milisegundos) en dos posiciones (*ON/OFF*) sin detener el movimiento del motor. La válvula puede soportar una presión de hasta 2 bar. Normalmente, una de las posiciones funciona para cargar los líquidos dentro de la jeringa y la otra posición sirve para impulsar el líquido hacia el *manifold* (Figura 3.1B). Las válvulas

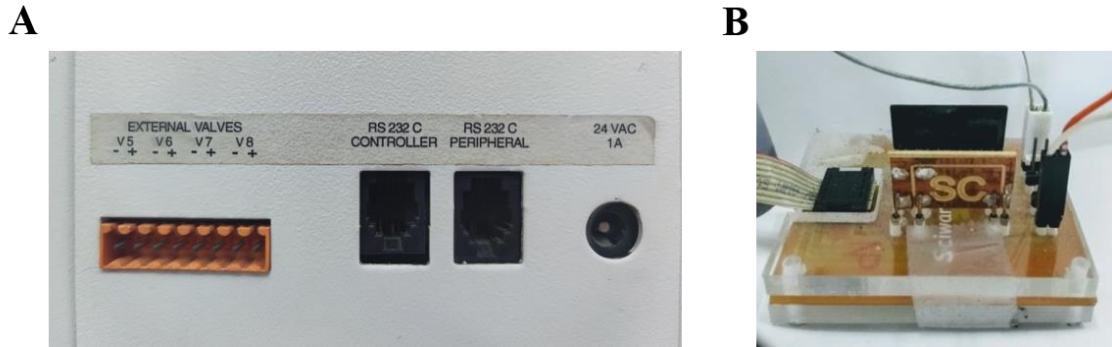


también cuentan con ajustes de PTFE al igual que los pistones y por ello, poseen una alta resistencia a disolventes orgánicos y reactivos corrosivos.



**Figura 3.1.** A) Módulo multijeringa de Crison, B) esquema de la vista frontal de la multijeringa con válvulas solenoides en la cabeza (1) de las jeringas (2), indicando las cuatro opciones de flujo con flechas (aspirar/*ON*, aspirar/*OFF*, dispensar/*ON*, dispensar/*OFF*) y barra con pistones accionada por el motor (3) [39,61].

En la parte trasera del módulo multijeringa se cuenta con una regleta para la conexión y control de hasta cuatro dispositivos (Figura 3.2A), tales como válvulas solenoides externas, microbombas, y agitadores, entre otros. En esta tesis, se ha empleado un agitador y una válvula solenoide adicional (esta última sólo en el sistema descrito en el capítulo 4), y se han conectado a la multijeringa a través de un dispositivo electrónico auxiliar para evitar el sobrecalentamiento (Figura 3.2B).

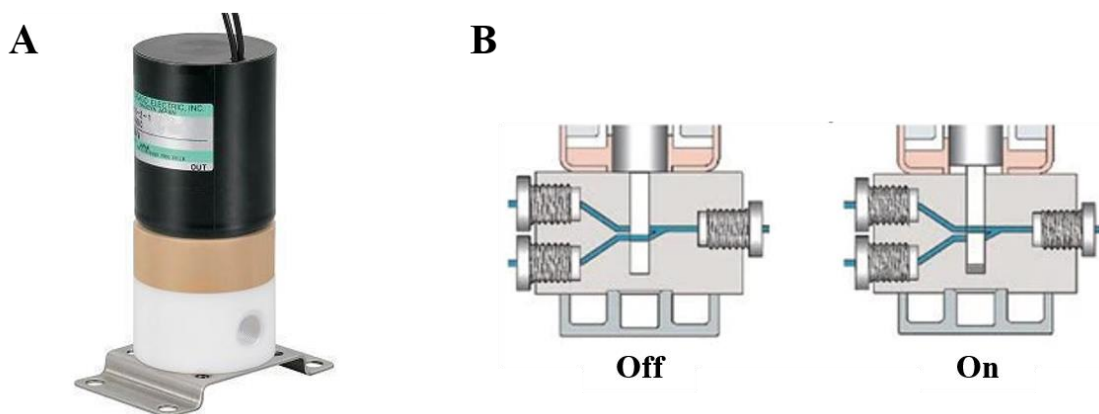


**Figura 3.2.** A) Panel trasero de la multijeringa con la regleta de conexión, puerto controlador y periférico y entrada de alimentación electrónica, B) dispositivo auxiliar.

### 3.1.2. Válvulas

#### 3.1.2.1. Válvula solenoide

La válvula solenoide (SV) externa de tres vías (Takasago Electric Inc, Japón) funciona igual que las válvulas solenoides del módulo multijeringa. Estas válvulas tienen un paso común y dos opcionales, de manera que cuando la válvula está desactivada (*OFF*) se conecta con uno de los caminos, y cuando está activada (*ON*) se conecta con el otro (Figura 3.3). La diferencia entre la válvula externa y las válvulas instaladas en la multijeringa es que la primera permite trabajar a presiones más altas (6 bar), pero a costa de un tiempo de conmutación más lento (50 milisegundos).

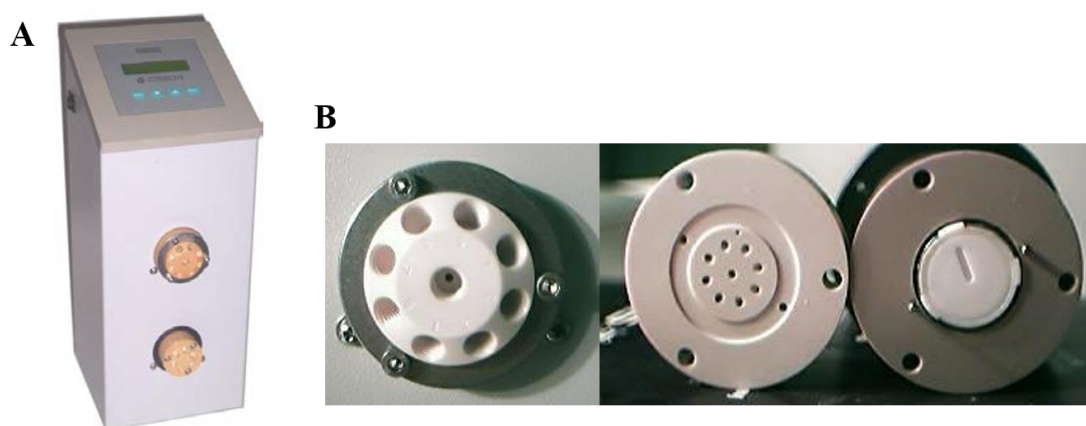


**Figura 3.3.** A) Válvula solenoide externa de Takasago, B) esquema representativo de la estructura interna de una SV de tres vías en las posiciones *OFF* y *ON* [62].

### 3.1.2.2. Módulo de válvulas

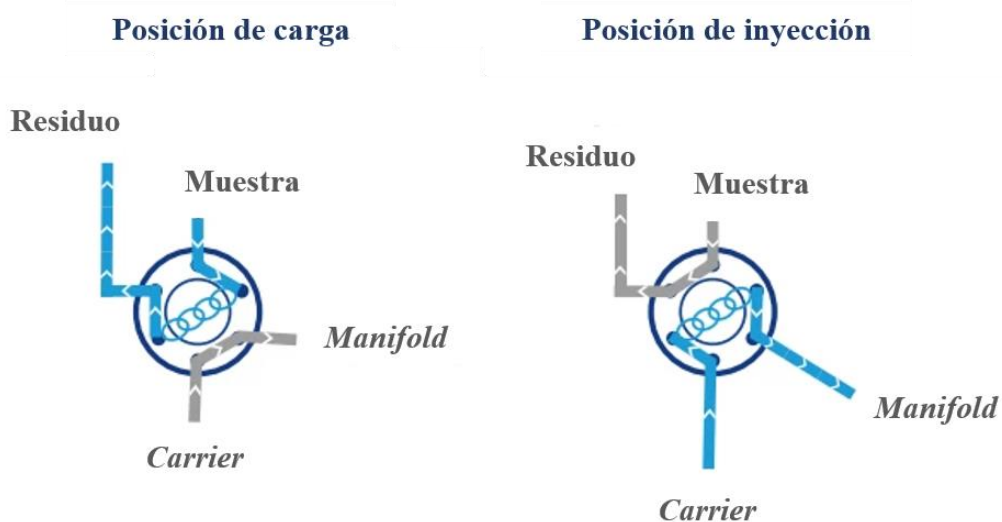
Para los trabajos presentados en esta tesis se ha usado un módulo de válvulas comprado en Crison, el cual incluye una válvula de selección en la parte superior y una válvula de inyección en la parte inferior (Figura 3.4A):

- La válvula de selección, también llamada válvula de multiposición (MPV) permite la conexión del puerto central con uno de los puertos laterales, y así aspirar o dispensar los diferentes líquidos. El número de puertos periféricos puede ser de 6, 8, 10 o más canales dependiendo del proveedor. En el caso de esta tesis, se usaron válvulas de 8 canales laterales. En la Figura 3.4B se aprecia con más detalle las partes de la válvula de selección.



**Figura 3.4.** A) Módulo de válvulas de Crison, B) Parte externa e interna de la MPV [39].

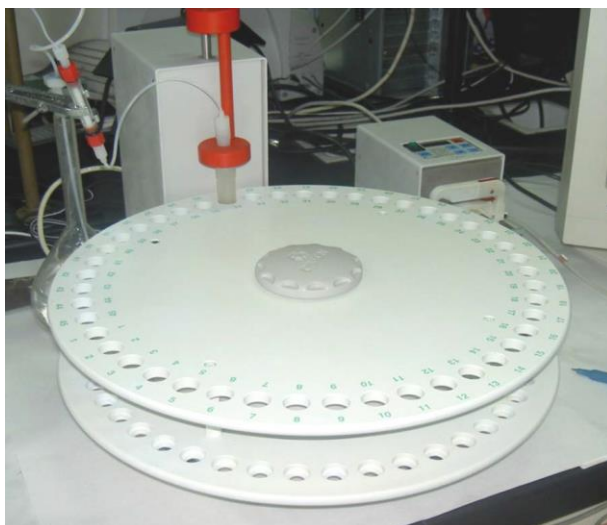
- La válvula de inyección (IV) rotatoria de 6 puertos posee dos posiciones diferentes, una para cargar y otra para inyectar (Figura 3.5). Cuando la válvula está en posición de carga (*load*), la muestra fluye a través de uno de los puertos, pasa por un bucle de carga (conectado entre dos puertos) y sale como residuo por otro puerto. Cuando la válvula inyecta (*injection*), el volumen de muestra almacenado en el bucle de carga es impulsado por el *carrier* (aire o agua) y sale por otro puerto hacia al exterior (el *manifold*).



**Figura 3.5.** Esquema representativo de las posiciones de carga e inyección de la IV [63].

### 3.1.3. Automuestreador

El automuestreador o muestreador automático es útil para la toma o deposición de muestras u otros líquidos desde recipientes acomodados en posiciones consecutivas. Para aspirar o dispensar los líquidos se utiliza un tubo insertado en una cánula [39]. En esta tesis se ha empleado un automuestreador circular, que consiste en una bandeja redonda de 45 posiciones para tubos de 10 mL (Figura 3.6). La ubicación en una posición determinada y la profundidad de penetración de la cánula en el interior del tubo se pueden controlar por ordenador.

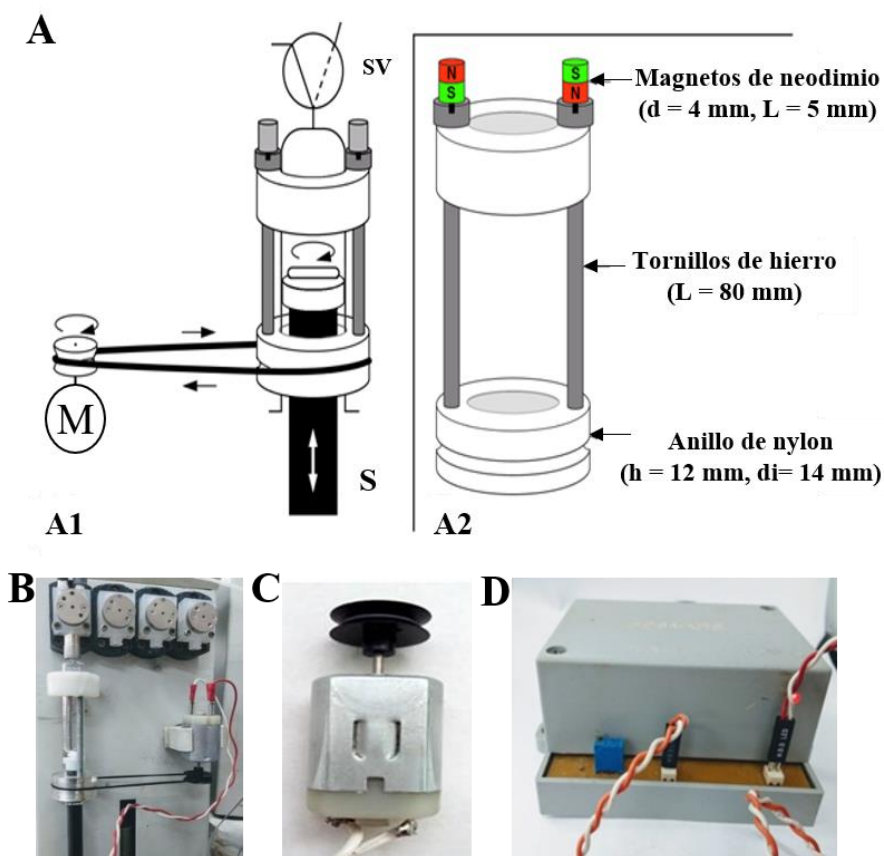


**Figura 3.6.** Muestreador automático de Crison [39].

### 3.1.4. Sistema de agitación magnética asistida en jeringa para DLLME

La DLLME en jeringa (descrita en el apartado 1.6.3) se ha llevado a cabo gracias al desarrollo de un sistema de agitación basado en un prototipo anterior [45]. El sistema de agitación (Figura 3.7) se compone de una diminuta barra agitadora (10 mm de longitud y 3 mm de diámetro) y un sistema de agitación magnética (MSA) (Sciware Systems S.L., Bunyola, España). El MSA está formado por tres elementos:

- Dispositivo de agitación externo (DAE): permite que la barra agitadora gire dentro de la jeringa y favorezca la dispersión del disolvente con la muestra. Este dispositivo se coloca alrededor de la jeringa y consiste en dos anillos (d.i. 14 mm, d.e. 30 mm) unidos por dos tornillos de hierro (L = 80 mm). Sobre cada tornillo se pone un imán de neodimio (L=5 mm x d = 4 mm). Los imanes se ubican estratégicamente frente a frente para mantener polaridades opuestas y la barra agitadora se coloca de acuerdo a la polaridad establecida en cada tornillo. Al vaciar la jeringa, la posición del pistón de la jeringa se ajusta 3 mm por debajo (para jeringas de 5 y 10 mL, respectivamente) para incluir el espacio ocupado por la barra agitadora.
- Motor: provoca la rotación del soporte de agitación y, con ello, de la barra agitadora. El motor se une al anillo inferior del DAE a través de una banda de goma elástica.
- Controlador de velocidad: consiste en un circuito que controla la velocidad del motor a través de una de las salidas traseras del módulo multijeringa. Con este dispositivo es posible ajustar las revoluciones del motor.



**Figura 3.7.** A) Esquema del sistema de agitación magnética (A1) y del soporte de agitación (A2) [45], B) vista frontal del MSA, C) motor (M), D) controlador de velocidad.

### 3.1.5. Tuberías y conectores

Los sistemas de tuberías o *manifold* empleados en los trabajos de automatización están fabricados en PTFE y tienen diámetros internos de 0,8 y 1,5 mm. La longitud de la tubería depende del diseño del sistema propuesto. Los conectores usados están hechos de polimetilmetacrilato (PMMA) o polieteretercetona (PEEK). Los materiales de fabricación tanto de las tuberías como de los conectores son resistentes a los disolventes orgánicos.

### 3.1.6. Software AutoAnalysis

El programa AutoAnalysis 5.0 fue usado para controlar los instrumentos descritos anteriormente. Este programa fue desarrollado por el grupo de Química Analítica Ambiental de la Universitat de les Illes Balears y es comercializado por Sciware Systems S.L. [39]. AutoAnalysis se compone

de una aplicación principal y un grupo de bibliotecas de enlace dinámico (DLLs) escritas en Delphi 5.0 y Visual C++ 6.0. La incorporación de un nuevo instrumento emplea una DLL para la comunicación y otra para el manejo de los dispositivos. AutoAnalysis es un programa muy flexible y fácil de usar por usuarios no especializados, y, por lo tanto, la programación del método depende en gran parte de la imaginación y del criterio del analista.

### 3.1.6.1. Configuración del Hardware

En el menú de *Hardware* se lleva a cabo la selección y configuración de los instrumentos usados en los capítulos 4 y 5 de esta tesis. Como se observa en la Figura 3.8, en la parte derecha se encuentran los canales de comunicación (DLLs) e instrumentos disponibles (B y C), y en la parte izquierda se muestra la configuración actual y guardada (A). En este caso, la conexión se establece primero con el canal Crison y luego, se añaden las DLLs individuales de los instrumentos: *Automatic MultiSyringe* (módulo multijeringa), *Automatic Valve* (módulo de válvulas) y *Autosampler* (módulo automuestreador).

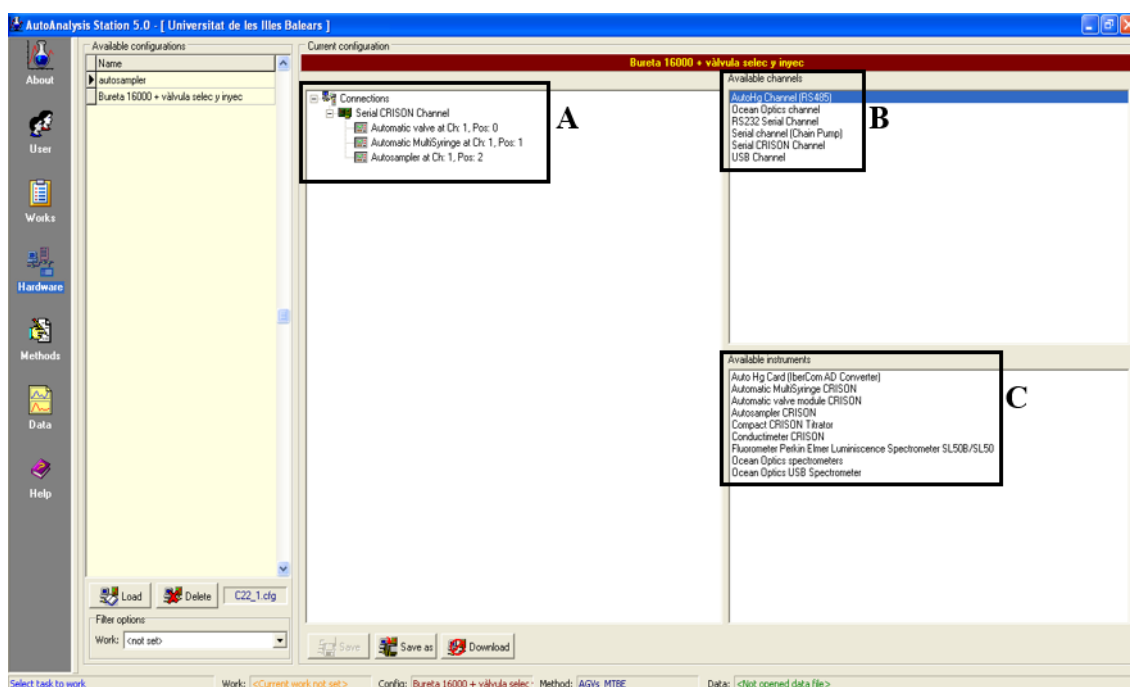


Figura 3.8. Menú Hardware de AutoAnalysis.

### 3.1.6.2. Desarrollo del método

Después de crear o cargar la configuración de *Hardware* guardada, en el menú *Methods* se realiza la edición del método. Este consiste en crear una secuencia de instrucciones que serán ejecutadas por los instrumentos conectados (aspirar, dispensar, cambiar de posición, etc.). Para elaborar métodos más ordenados, las instrucciones se pueden agrupar en procedimientos y varios procedimientos se pueden unir en un método. También, se incluyen los comandos ejecutados por el sistema, tales como la llamada de procedimientos (*call procedure*), la repetición de una secuencia de pasos (*loop*), la definición de tiempos de espera (*wait*) y otros adicionales.

En el caso de esta tesis, se han creado los procedimientos de extracción y de limpieza, y se han agrupado en un solo método. El comando *loop* ha sido útil para repetir el procedimiento de limpieza y la función *wait* se ha empleado para establecer los tiempos de agitación y separación de las fases.

La ventana de AutoAnalysis para la creación del método analítico se muestra en la Figura 3.9. En la columna (A) se presenta el orden secuencial de las instrucciones. En la columna (B), se elige el instrumento o se selecciona una orden de la lista de comandos y se especifica la acción deseada. La columna (C) proporciona los detalles resumidos de la acción a realizar por el instrumento.

Para corroborar la ausencia de errores: antes de ejecutar el método, se puede realizar una simulación del mismo sin activar los instrumentos. Al ejecutar el método, se permite controlar la ejecución de la instrucción y comprobar el estado de ejecución de cada acción [39].



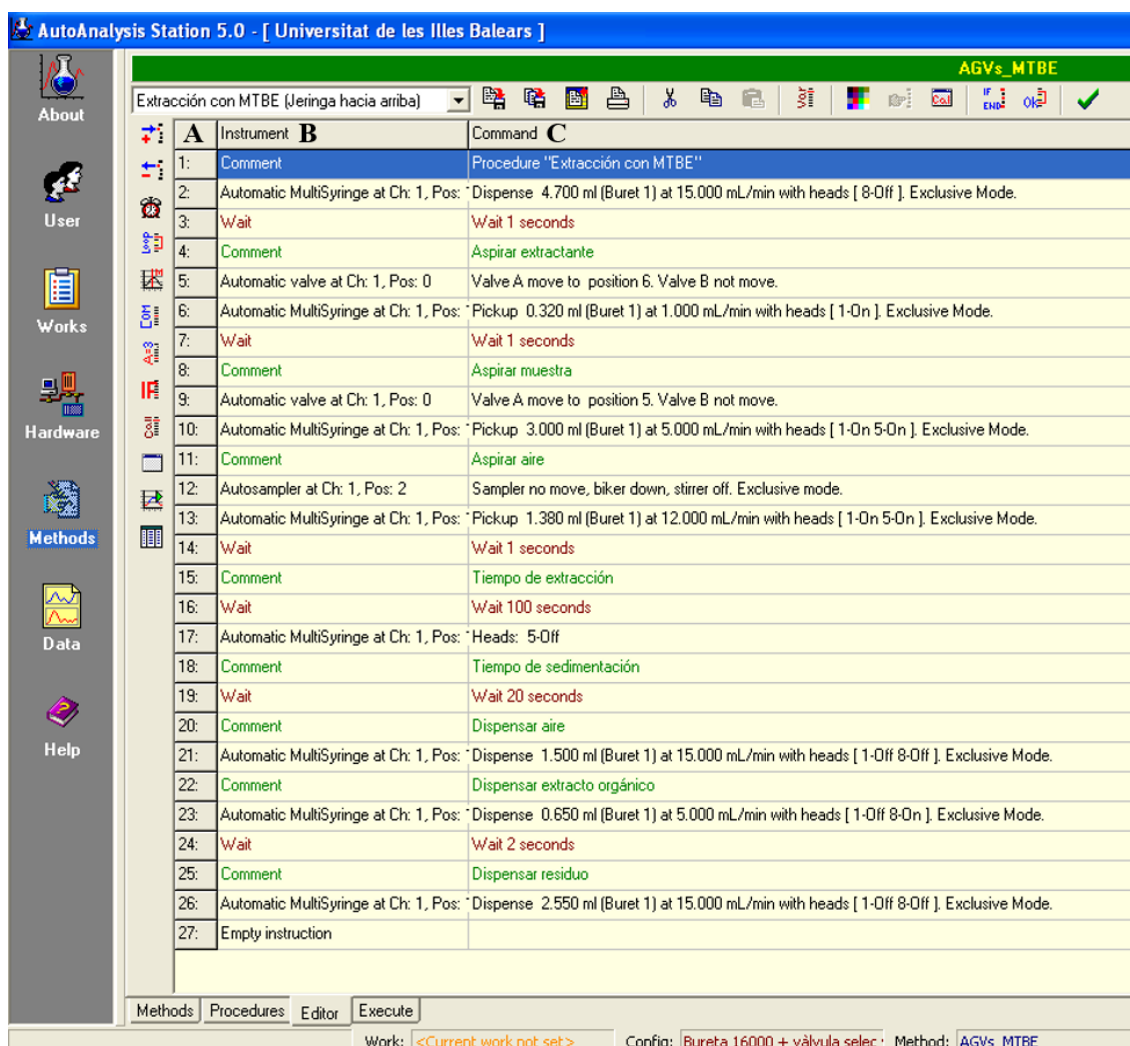


Figura 3.9. Menú Editor de AutoAnalysis.

## 3.2. Técnicas instrumentales

### 3.2.1. Espectroscopía ultravioleta-visible

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto a partir de la obtención de sus espectros de absorbancia. Cuando las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas (en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm), sus electrones se excitan y pasan desde un estado fundamental a un estado excitado. La ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia ( $A$ ) es directamente proporcional a la concentración ( $c$ ) del compuesto o molécula en la disolución, al coeficiente de extinción o absorptividad molar ( $\epsilon$ ) y a la longitud ( $l$ ) del paso óptico de la cubeta (generalmente 1 cm), según la siguiente ecuación:  $A = c \cdot \epsilon \cdot l$ . Por su parte, la absorbancia viene dada por la relación entre la intensidad de haz incidente ( $I_0$ ), y la intensidad del haz transmitido tras pasar por la muestra ( $I$ ):

$A = \log \left( \frac{I_0}{I} \right)$ . Como la absorbancia no tiene unidades, generalmente, se expresa como unidades arbitrarias (UA).

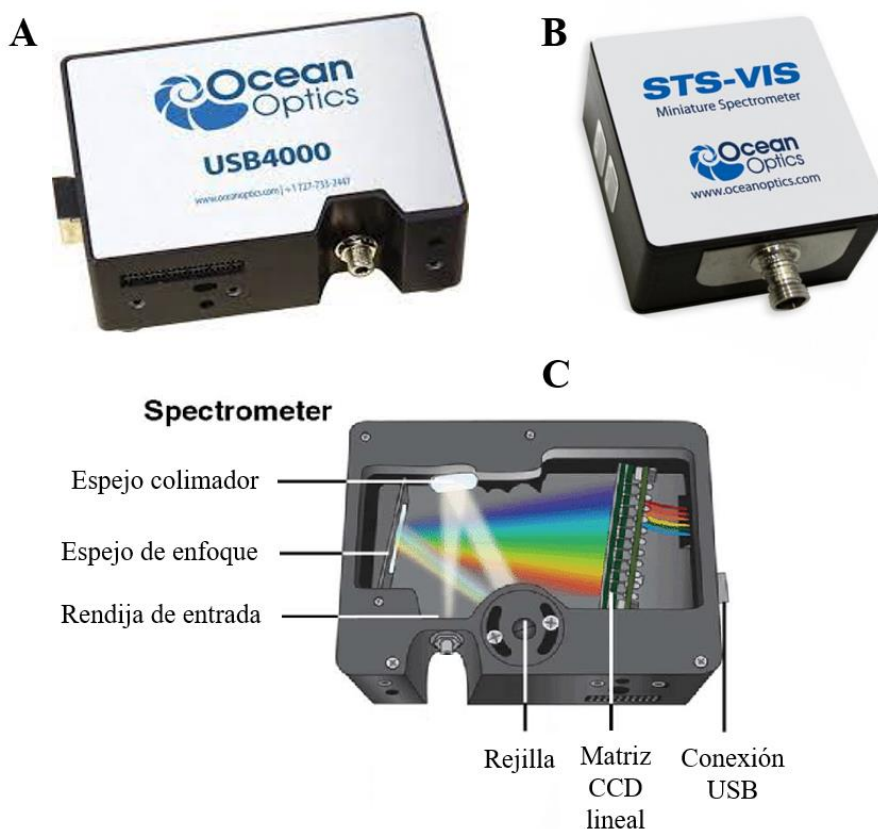
Un espectrofotómetro UV-Vis mide la cantidad de luz absorbida por la muestra. Se compone principalmente de una cubeta, un portacubetas, una fuente de luz (generalmente una lámpara de deuterio o tungsteno), un selector de longitud de onda y un detector. Este instrumento puede ser de un solo haz, de doble haz o poseer una red de fotodiodos. La diferencia está en que los dos primeros incluyen un monocromador entre la muestra y la fuente de luz, mientras que el último no lo incluye, y en su lugar posee una matriz de diodos para la detección simultánea de la absorbancia en todas las longitudes de onda [64].

Otra posibilidad es usar como sistema de detección dispositivos de carga acoplada (CCD), que tienen la capacidad de recolectar simultáneamente todo el espectro de luz al igual que la matriz de diodos. El detector CCD usa una serie de fotosensores (píxeles) muy sensibles a la luz que responden a las longitudes de onda incidentes. A diferencia de los espectrofotómetros de matriz de diodos, los CCD tienen un tamaño pequeño, un bajo consumo energético y pueden enviar la señal del espectro a un programa de computadora vía USB [65].

### 3.2.1.1. Espectrofotómetro Ocean Optics

En el sistema desarrollado para la determinación de hierro (capítulo 7) se han utilizado dos espectrofotómetros CCD miniaturizados (Figura 3.10) de la compañía Ocean Optics (Dunedin, Florida, USA) que fueron conectados a través del puerto USB de un ordenador:

- El espectrofotómetro USB4000: es un detector con una avanzada y potente electrónica, diseñado a partir del modelo USB2000. Este dispositivo responde en el rango UV-Vis e infrarrojo cercano (NIR) con longitudes de onda desde 200 a 1100 nm [66].
- El espectrofotómetro STS-VIS: es un sensor más compacto y económico que el USB4000. El STS-VIS incluye un sensor de imagen lineal que funciona con un bajo consumo de energía (0,75 W) y responde en un rango de longitud de onda de 250 a 800 nm [67].



**Figura 3.10.** Espectrofotómetros Ocean Optics: A) USB4000, B) STS-VIS, C) componentes del espectrofotómetro USB4000 [66,67].

Para el control de los espectrofotómetros y la medición de la absorbancia se utilizó el programa SpectraSuite 2.0, también de Ocean Optics. Esta plataforma de espectroscopia modular basada en Java, funciona en todos los sistemas operativos y con cualquier espectrofotómetro de conexión USB [68].

### 3.2.2. Cromatografía

La cromatografía es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla antes de que se puedan identificar y cuantificar con las técnicas de detección. En general, los componentes básicos de un cromatógrafo incluyen un inyector de muestra, una fase estacionaria (columna) y un detector. En la cromatografía, la muestra se transporta en la corriente de un fluido (fase móvil) a través de la columna y sus componentes se distribuyen dependiendo de su afinidad por la fase móvil o la estacionaria. Los componentes que tengan mayor afinidad por la columna son retenidos durante más tiempo y se desplazan lentamente, mientras que aquellos que se retengan menos

avanzan más rápido junto con la fase móvil. Dependiendo si la fase móvil es líquida o gaseosa, la cromatografía se divide comúnmente en dos tipos: cromatografía líquida y cromatografía de gases.

### **3.2.2.1. Cromatografía líquida**

En la cromatografía líquida (LC) la fase móvil es un líquido que se bombea a un caudal específico a través de una columna. En la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), la fase estacionaria consiste en un material sólido poroso con una elevada área superficial, empaquetado en una columna, por la que se hace circular la muestra a alta presión. La separación cromatográfica se lleva a cabo cuando los componentes de la muestra interactúan tanto con la fase móvil como con la fase estacionaria.

Con base a la polaridad de la fase estacionaria y la fase móvil, se puede diferenciar entre LC de fase normal y LC de fase reversa. En la cromatografía de fase normal la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, y en la fase reversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Generalmente, la fase estacionaria en la cromatografía de fase reversa consiste en un relleno de material hidrofóbico (C18, C8, C4, etc.) que se encuentra enlazado a un soporte de sílice y la fase móvil consiste en agua (componente más polar) y un solvente orgánico (reductor de polaridad). Cuando los analitos son ionizables, se requiere que la fase móvil tenga tampones u otros aditivos.

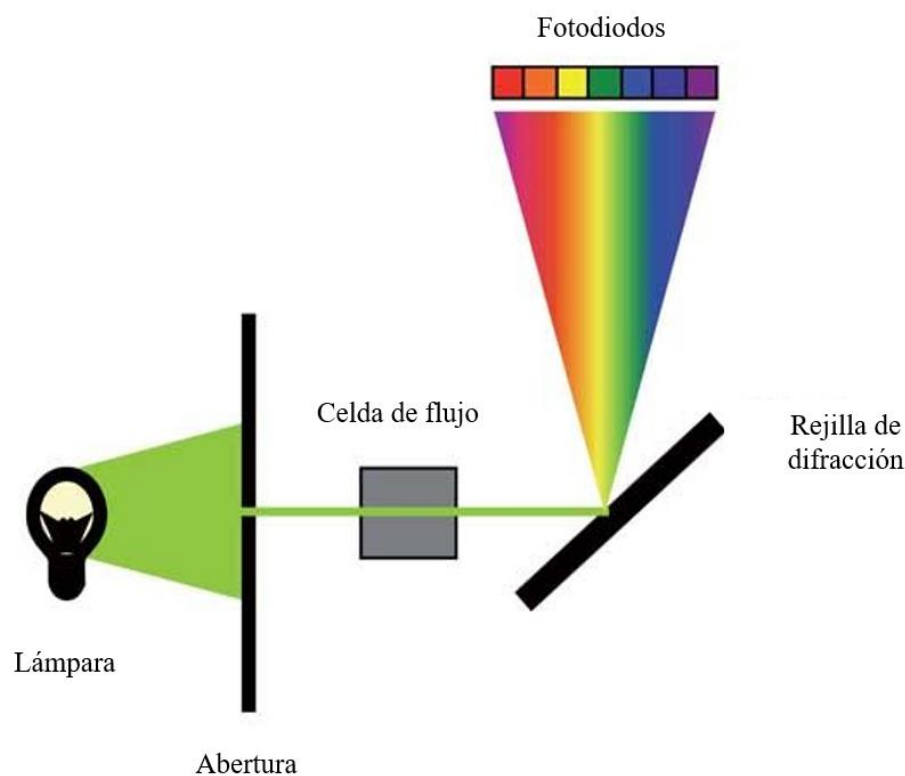
La elución puede ser de dos tipos, isocrática (fase móvil constante) o en gradiente (mezclas en la fase móvil). En una separación en fase reversa, los analitos menos polares eluyen al final debido a su fuerte afinidad con la columna. Este proceso se ve favorecido cuando el gradiente de la fase móvil varía desde una mezcla altamente polar a una menos polar.

Cuando los componentes de la muestra llegan al final de la columna, la cantidad de cada componente se transforma en una señal eléctrica gracias al detector. El tiempo que tarda un componente específico en salir de la columna se le llama tiempo de retención (expresado en minutos) [69].

#### **3.2.2.1.1. Detector de diodos**

Los detectores basados en absorbancia UV-Vis son los detectores más comúnmente utilizados en la LC. El detector de matriz de diodos (DAD) utiliza una lámpara que dirige la luz blanca a través de la celda de flujo por donde pasa la muestra. La luz transmitida incide sobre una rejilla de

difracción y, finalmente, sobre la matriz lineal de fotodiodos (Figura 3.11). La salida de luz de la matriz es usada para construir el espectro de absorción. Esta matriz de diodos cubre longitudes de onda de 190 a 800 nm. Pero la mayoría de los analitos orgánicos se analizan en un rango UV de 190 a 350 nm. El detector puede dar la absorbancia del espectro completo, en un rango o en una longitud de onda específica, donde haya una absorbancia máxima [70,71].



**Figura 3.11.** Esquema representativo del funcionamiento del detector de matriz de diodos [70].

Para el análisis de los compuestos fenólicos de esta tesis se ha usado un HPLC de la marca Waters (Milford, USA), equipado con una bomba cuaternaria (600), un detector DAD (2996) y un automuestreador (717 plus). Para el control del equipo y la adquisición de datos se ha utilizado el programa Empower 3.0. Los analitos se han separado con una columna Symmetry® C18 (150 mm x 3,9 mm, d.i. 5  $\mu\text{m}$ ) de Waters y el flujo se ha mantenido a 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . La fase móvil ha consistido en acetonitrilo (A) y agua (B) ajustada a pH 2,8 con ácido sulfúrico para mantener la forma molecular de los compuestos fenólicos durante su análisis. Los fenoles se han analizado en un rango UV de 190 a 400 nm. Una descripción más precisa del análisis cromatográfico se da en el apartado de materiales y métodos del trabajo recogido en el capítulo 8.

### 3.2.2.2. Cromatografía de gases

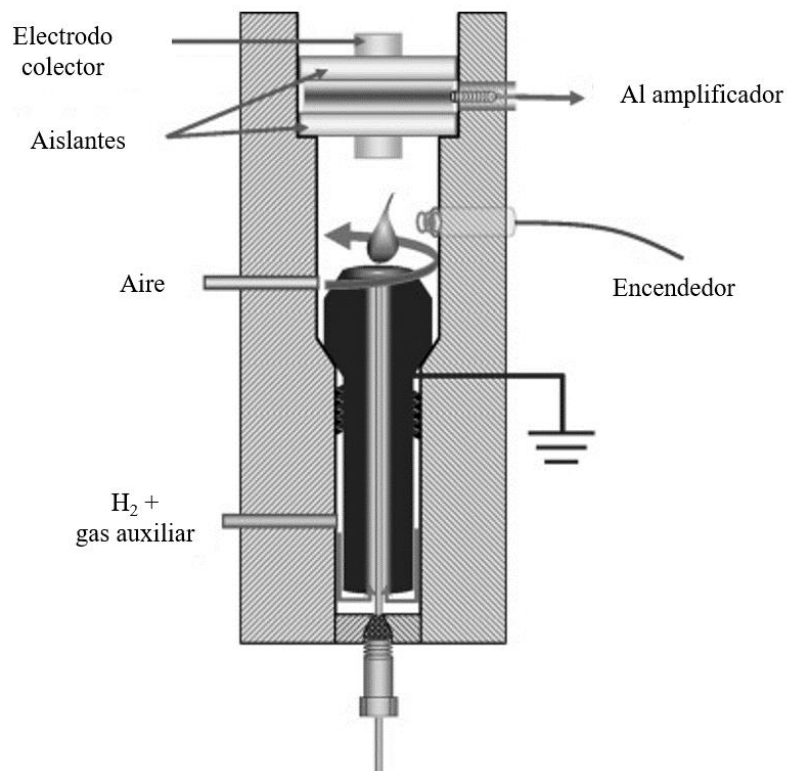
La cromatografía de gases (GC) es empleada para compuestos que puedan volatilizarse sin descomponerse térmicamente. En la GC, la muestra se vaporiza en el inyector y los componentes de la muestra se separan debido a su interacción con la fase estacionaria de la columna. A diferencia de la LC, los componentes no interaccionan con la fase móvil (gas portador) debido a que esta es un gas inerte (comúnmente helio, nitrógeno o hidrógeno) que solo tiene el propósito de transportar la muestra a través de la columna. Además, se usa un horno para garantizar la vaporización de la muestra durante la separación y para crear rampas de temperatura, utilizadas especialmente en la separación de compuestos con polaridades similares.

Las columnas capilares son las más usadas en la GC. Son construidas en sílice, con un revestimiento de poliamida, flexible y resistente a altas temperaturas, y una capa delgada de una fase estacionaria altamente selectiva para los analitos objetivo. Su diámetro interno está entre 0,1 y 0,53 mm, y pueden tener longitudes entre 10 y 150 m. Con respecto al inyector, el más común es el tipo *split/splitless*, el cual tiene la posibilidad de inyectar toda la muestra (*splitless*) o solo una determinada parte de ella (*split*).

Existen varios detectores para GC y entre ellos, los más utilizados son el detector de ionización de llama (FID) y la espectrometría de masas (MS) [72]. A continuación, se explica cada uno y se describe de manera breve la metodología empleada en cada caso.

#### 3.2.2.2.1. Detector de ionización de llama

Es el detector más usado debido a su alta sensibilidad, amplio rango lineal y respuesta universal. En un detector FID, las moléculas de una sustancia son quemadas por una llama de hidrógeno-aire y se producen iones en el proceso. Una acumulación de iones en el electrodo colector crea una pequeña corriente eléctrica por medio de una diferencia de potencial. Esta corriente eléctrica luego es amplificada por un electrómetro, dando lugar a la señal analítica, expresada en voltaje (Figura 3.12). En general, el FID opera entre 200 y 250 °C, y se usa comúnmente debido a sus costos relativamente bajos [73].



**Figura 3.12.** Esquema representativo de un FID [73].

En esta tesis se ha empleado un cromatógrafo de gases YL-Clarity 6500 (Young in Chromass Co. Ltda., Anyang, Korea) con un inyector y un detector FID de la misma marca, para la determinación de AGV. Para la separación de los analitos se ha usado una columna capilar polar con una fase estacionaria libre de ácido graso (DB-FFAP, 30 m x d.i. 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) de Agilent Technologies (California, USA). DB-FFAP es una columna de polietilenglicol modificada con ácido nitrotereftálico y es especial para el análisis de AGV. Como gas portador se ha usado nitrógeno a una tasa de flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . En el apartado de materiales y métodos del artículo presentado en el capítulo 4 de esta tesis se detallan más especificaciones sobre la rampa de temperatura utilizada, y las condiciones de inyección y detección.

#### 3.2.2.2.2. Espectrómetro de masas

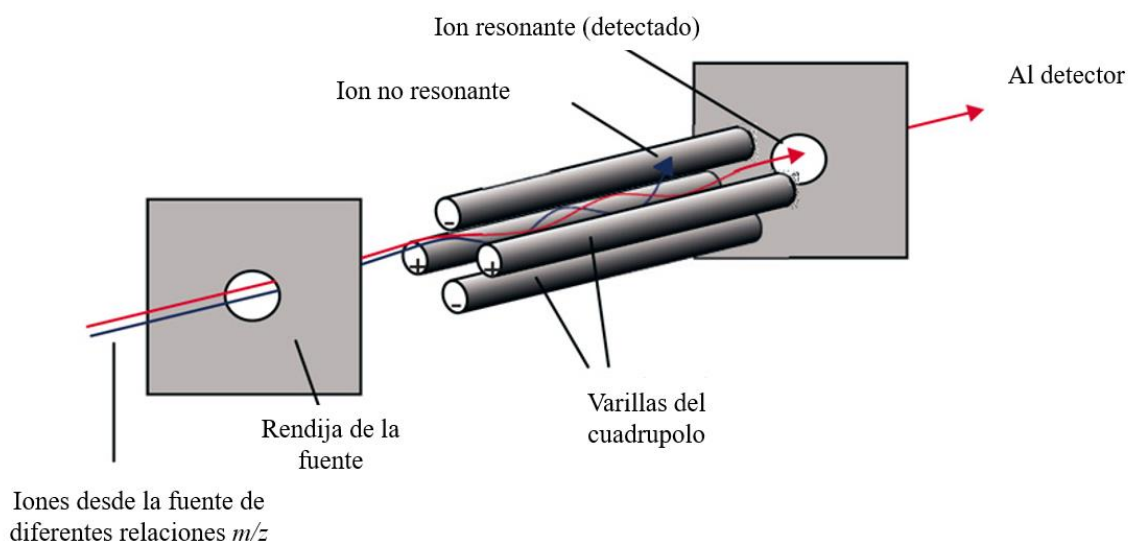
El espectrómetro de masas (MS) proporciona información cualitativa y cuantitativa de diversos compuestos. Mediante el análisis por MS se puede obtener información sobre la composición atómica y molecular de los compuestos analizados, así como de su concentración. Con respecto al FID, el MS es un equipo más costoso, pero mucho más sensible y selectivo.

El espectrómetro de masas tiene tres elementos básicos: primero, la fuente de ionización que emite un haz de electrones encargado de ionizar la muestra en iones gaseosos. Segundo, el analizador de masas, donde los iones generados son acelerados y se separan según su relación masa/carga ( $m/z$ ) y abundancia isotópica. Tercero, el detector, el cual mide la abundancia de los iones que llegan y produce una señal eléctrica que se transmite al ordenador. El registro final obtenido se llama espectro de masas y consiste en mostrar la abundancia de los iones en relación a su  $m/z$ .

El modo de ionización más empleado es el impacto electrónico (EI) a 70 eV. Se suelen utilizar 70 eV debido a que esta es la energía óptima para obtener una mayor abundancia de iones moleculares.

El analizador cuadrupolo es el más usado. Con este, solo aquellos iones que tengan una  $m/z$  específica son iones resonantes (trayectoria estable entre los electrodos) y alcanzan el detector (Figura 3.13). Hay dos modos de análisis:

- Modo SCAN: se realiza un barrido en un determinado intervalo  $m/z$ .
- Modo de monitorización de iones seleccionados (SIM): se determinan las condiciones para que pasen solos iones con determinadas  $m/z$ . Con este modo de análisis, se consigue aumentar la selectividad para analitos individuales y disminuir la respuesta al resto de analitos [74].



**Figura 3.13.** Esquema representativo de un analizador MS cuadrupolo [75].



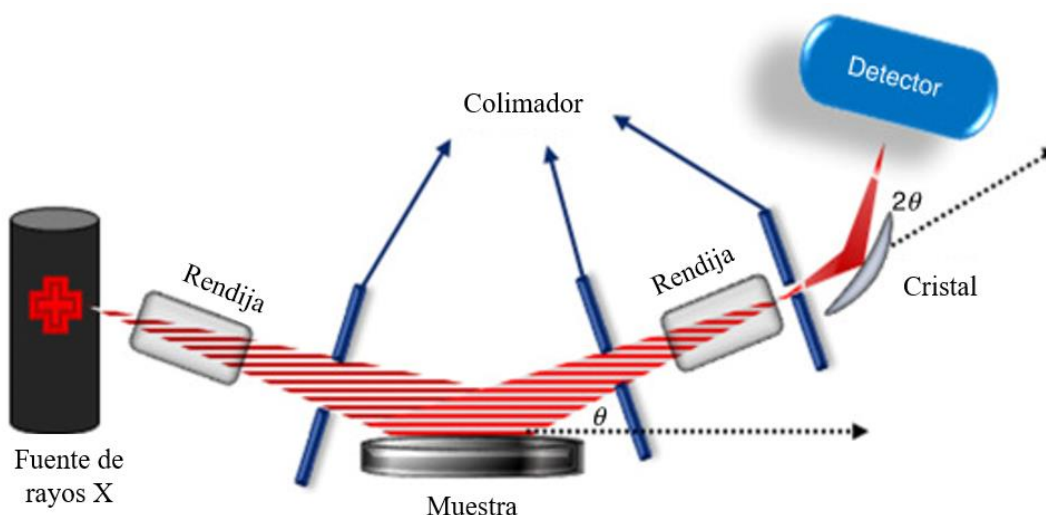
En esta tesis la separación y detección de los LCFA se ha llevado a cabo con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (HP) 7890A y un espectrómetro de masas HP 5973C (Agilent Technologies, California, USA). Para el control del sistema instrumental y la adquisición de datos del GC-MS se ha utilizado el programa HP Chem-Station. Los analitos se han separado usando la misma columna empleada para los AGV y se ha utilizado helio como gas portador a una tasa de flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Se ha trabajado en el modo de impacto electrónico a 70 eV y se ha usado una librería NIST MS Search 2.0 para la identificación de los compuestos. El modo SCAN se ha fijado a una  $m/z$  de 50 a 550 para la identificación inicial de los analitos. En la parte experimental del artículo relativo al capítulo 5 se encuentran más detalles sobre las condiciones empleadas para la inyección, la rampa de temperatura y el modo SIM.

### 3.2.3. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (XRD) es una técnica no destructiva que permite la identificación y caracterización estructural de materiales cristalinos. Dado que los rayos X tienen longitudes de onda comparables a las existentes en el espacio interatómico de un sólido cristalino, los rayos X que ingresan en el material son difractados por los átomos que se encuentren en su camino. El fenómeno de difracción en sólidos ordenados cumple la ley de Bragg:  $n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl}$  [76,77]. Donde:  $n$  es un número entero,  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación incidente,  $d$  es el espaciado interplanar,  $\theta$  es el ángulo de incidencia, y  $(hkl)$  son los índices de Miller de la línea de difracción considerada.

Debido a que el patrón de difracción de rayos X es característico para cada tipo de estructura, esta técnica constituye un instrumento muy valioso para la caracterización de sólidos cristalinos. Esto permite la identificación de los materiales, mediante la comparación de los patrones obtenidos con los ya reportados en la literatura y en bases de datos.

El difractómetro de rayos X se compone básicamente de una fuente de rayos X, rendijas, ventanas o colimadores que delimitan el área iluminada y limitan la divergencia del haz, una zona plana donde se coloca el portamuestra y un detector que recibe la radiación dispersada por la muestra (Figura 3.14). El resultado es un registro (difractograma) de la intensidad del haz de rayos X difractado frente al ángulo de difracción ( $2\theta$ ) [78].



**Figura 3.14.** Esquema representativo de los componentes del XRD [79].

El difractograma del MOF MIL-100(Fe) que se muestra en el capítulo 8 de esta tesis fue registrado en un difractómetro Siemens (D5000). Las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente en atmósfera libre empleando radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ), un intervalo angular ( $2\theta$ ) de  $1\text{-}20^\circ$ , un tamaño de paso de  $0,04^\circ$  y un tiempo de residencia de 5 s/paso.

### 3.2.4. Adsorción/desorción física de gases

El análisis textural de un material incluye la determinación de su área superficial, la distribución de poros, y el tamaño y volumen de poro, parámetros que se puede determinar por medio de distintas técnicas siendo la adsorción física de gases, y más concretamente de nitrógeno a 77 K, una de la más usadas. Para un determinado sistema gas/sólido, la cantidad de gas adsorbido por gramo de sólido, a temperatura constante, depende, en el equilibrio, de la presión. Representando la cantidad de gas adsorbida frente a la presión relativa, a temperatura constante se obtiene la isoterma de adsorción cuya forma depende de la textura del material. Para interpretar la isoterma se hace uso de modelos más o menos simplificados, entre los que se encuentran el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET) que es uno de los procedimientos más utilizados para la determinación de la superficie específica y el método *Two-Dimensional Non-Local Density Functional Theory* (2D-NLDFT) ampliamente usado para la determinación del tamaño y distribución de poros [80,81].

Las isothermas de adsorción-desorción que se presentan en esta tesis se obtuvieron con un instrumento Micrometrics Tristar II 2020 Analyser usando nitrógeno como adsorbato. Previamente, las muestras se desgasificaron a 473 K durante 6 h.

### **3.2.5. Microscopía electrónica de barrido**

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite obtener imágenes de elevada calidad y gran resolución mediante la detección de los electrones retrodispersados y secundarios emitidos por la muestra cuando se hace incidir sobre ella un haz de electrones. Como resultado se obtienen imágenes con una gran profundidad de campo, ya que se puede enfocar simultáneamente zonas más o menos elevadas de la muestra, produciendo la sensación de relieve típica de esta modalidad de microscopía [82].

En esta tesis doctoral, las micrografías electrónicas que se muestran en el capítulo 8 se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3400N, equipado con un sistema de espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS) Bruker AXS Xflash 4010. Para evitar problemas, causados por la acumulación de carga eléctrica, las muestras fueron recubiertas por vaporización con una fina capa de oro.

## **3.3. Diseño e impresión 3D**

El procedimiento general para la fabricación de los dispositivos impresos en 3D, utilizados en los sistemas portátiles desarrollados en esta tesis (capítulos 6-8), es el siguiente:

### **3.3.1. Diseño**

Se realizó por medio del programa Rhinoceros 5.0 SR11 32 (McNell and Associates, USA). Rhinoceros es un programa de diseño asistido por computadora (CAD) creado inicialmente como un complemento para AutoCAD (Autodesk, California, USA). Este programa es uno de los más populares en el diseño 3D debido a su relativo bajo costo y gran versatilidad. Rhinoceros se utiliza principalmente en arquitectura, ingeniería y diseño industrial. Las herramientas de partida para el modelado en 3D incluyen puntos, curvas, superficies, sólidos y mallas [83].

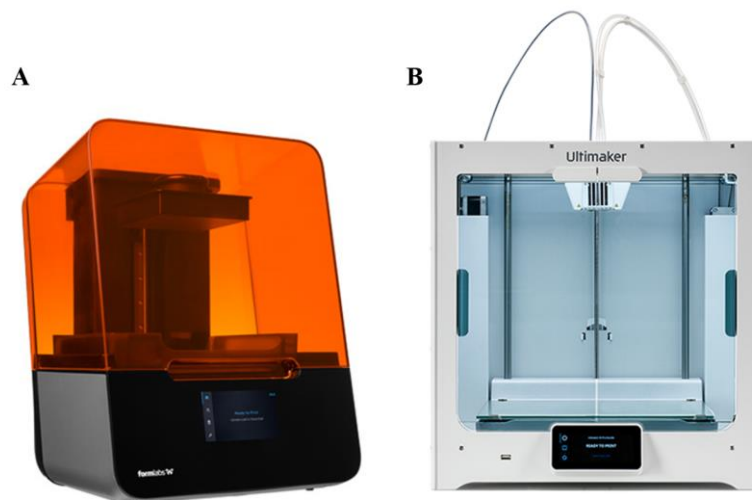
En la edición de los modelos de esta tesis se han usado especialmente herramientas generales (eliminar, recortar, copiar y pegar) y operaciones booleanas como unir, intersecar, sustraer o extruir sólidos geométricos. Para construir piezas a medida se ha usado un pie de rey digital y en el programa se ha medido con las opciones longitud, radio o distancia.

Una vez finalizado el diseño, se realiza la importación de los datos a la impresora. Para esto, el diseño se guarda como un archivo en formato STL y se abre en un programa que gestiona y envía la impresión.

### 3.3.2. Impresión

En esta tesis doctoral se han usado dos impresoras diferentes, por lo que se han empleado dos programas de impresión distintos. PreForm 2.15.1 (Formlabs, Someville, USA) y Ultimaker Cura 4.9.0 (Ultimaker, Massachusetts, USA) correspondientes a las impresoras Form 3 y Ultimaker S5, respectivamente (Figura 3.15). Ambos programas se pueden descargar gratis desde las páginas web de los proveedores de las impresoras y permiten acciones como colocar soportes automáticos o manuales, posicionar, duplicar, rotar y escalar el objeto en el plano de impresión. También realizan una estimación del número de capas, del tiempo y del volumen de material requerido para la impresión.

Para los dispositivos obtenidos de la impresora Form 3 se han usado resinas fotopoliméricas de Formlabs: Una de color negro (*Black resin*) para imprimir el portacubeta y un soporte para la fuente de luz incluidos en el sistema descrito en el capítulo 7, y una transparente (*Clear resin*) para imprimir el agitador de paletas para SPE descrito en el capítulo 8. Las resinas son una mezcla de ésteres de ácido metacrílico y un fotoiniciador. La resina negra incluye además como aditivo, un pigmento patentado. Debido a su gran tamaño, la caja 3D del capítulo 6 se ha fabricado con la impresora Ultimaker S5 usando un filamento termoplástico biodegradable (*Black PLA*) de color negro de 3 mm de grosor (Fillamentum, Hulin, República Checa). En los trabajos de los capítulos 6 a 8 se dan más detalles sobre el diseño, impresión y dimensiones de los dispositivos.



**Figura 3.15.** Impresoras 3D: (A) Form 3 [84], (B) Ultimaker S5 [85].

### 3.3.3. Limpieza y curado

Las piezas fabricadas con la impresora Ultimaker S5 se despegan inmediatamente de la plataforma una vez terminada la impresión y no necesitan un tratamiento adicional. Por su parte, las piezas elaboradas con la impresora Form 3 requieren de un lavado con alcohol isopropílico para eliminar los monómeros sin polimerizar. Tras el lavado, las piezas se secan con un flujo de nitrógeno gaseoso y, finalmente para completar la polimerización, y brindar mayor estabilidad mecánica, las piezas se dejan durante 4 h en una cámara de poscurado CL-1000 (UVP, Upland, California, USA) que incluye una lámpara UV a 365 nm.

### 3.3.4. Medidas de seguridad

Las resinas y los filamentos pueden causar irritación en la piel, los ojos y el sistema respiratorio. El isopropanol es un líquido inflamable que puede causar irritación en la piel y los ojos, y somnolencia y vértigos si es inhalado. Una manipulación inadecuada de la impresora o de la cámara de curado puede provocar una exposición peligrosa a la radiación y a sus componentes móviles. La acción de retirar los soportes de las piezas impresas puede provocar que salten pequeños fragmentos hacia el rostro.

En general, como medidas de seguridad se aconseja usar guantes (nitrilo), gafas protectoras o un protector facial, delantales, batas de laboratorio, pantalones largos y camisas largas al momento de manipular la resina, retirar los soportes de las piezas impresas o limpiar la impresora. Después de la manipulación de la resina o de piezas sin curar, se recomienda lavar bien las manos, la piel y la ropa que han entrado en contacto directo. Al momento de despegar la pieza impresa de la base de impresión, se debe orientar las herramientas de corte o raspado en sentido contrario al cuerpo. Además, se debe asegurar una ventilación adecuada en la zona de impresión, instalar un extractor de gases y disponer de duchas de seguridad y lavaojos cerca al área de trabajo.

Aunque el sistema de enclavamiento de las impresoras y la cámara de curado permite apagar automáticamente la radiación cuando la tapa está abierta. Si este sistema es manipulado o falla existe el riesgo de exposición a la radiación. Por lo tanto, se recomienda no abrir la tapa de estos dispositivos hasta que la operación finalice o se pause. El uso y mantenimiento de las impresoras solo debe ser realizado por personas calificadas para este trabajo.

El isopropanol debe mantenerse lejos de superficies calientes, fuentes de ignición y otros materiales incompatibles (oxidantes, ácidos, etc.). Las resinas y los filamentos deben guardarse en un lugar seco y frío (máximo 30 °C). El filamento PLA no representa un peligro para la salud humana y el medio ambiente. No obstante, las resinas no son biodegradables, por lo tanto, se debe

evitar su liberación en el medio ambiente y desecharse como un residuo químico. Si la resina está completamente curada, puede desecharse como un residuo doméstico [86–92].

### 3.4. Programa ImageJ

ImageJ es un programa de dominio público basado en Java y diseñado para el procesamiento de imágenes digitales. Fue creado en 1997 por el Instituto Nacional de Salud de USA y el Laboratorio de Instrumentación Óptica y Computacional (LOCI, Universidad de Wisconsin) bajo el nombre de NIH Image [93]. Actualmente es una herramienta muy popular para el análisis de imágenes de cualquier campo científico (microscopía, radiología, hematología, etc.) debido a su capacidad multitarea, rapidez y su arquitectura abierta que brinda extensibilidad a través de plugins y macros grabables. ImageJ permite desarrollar plugins personalizados usando el editor del mismo programa para facilitar la resolución de problemas del procesado y análisis de imágenes.

El programa tiene una amplia gama de funciones. Las más básicas incluyen acciones como cortar, copiar, pegar, escalar, ampliar, rotar, aplicar nitidez o suavizar. Entre otras, también se puede contar el número de píxeles de una imagen, calcular la intensidad de color en toda la imagen o en un área seleccionada definida por el usuario. Además, permite crear histogramas, aplicar la convolución RGB, la escala de grises, el análisis de Fourier y otros filtros guardados en el programa. ImageJ es compatible con imágenes de 8, 16 y 32 bits en los formatos TIFF, GIF, JPEG, PNG, BMP, DICOM, FITS y RAW.

El procedimiento general para llevar a cabo el análisis RGB en ImageJ depende de si se analiza una única selección o múltiples selecciones en la imagen digital. Si se trata de una única selección, la opción más simple es realizar directamente la convolución RGB a la imagen cargada (*File > Open*) con la opción de la barra menú: *Image > Color > Split channels*. La convolución se refiere al despliegue de una imagen en tres canales de color rojo (R), verde (G), azul (B) similar a una imagen en escala de grises. Luego, se dibuja un óvalo, un cuadrado o una forma libre (*Freehand selection* de la barra de herramientas) para seleccionar la posición y el área que desea analizarse en un canal específico. Después, se utiliza el histograma (*Analyze > Histogram*) que muestra el valor promedio de intensidad del color y otros datos de interés. El promedio se refiere a los valores obtenidos para los puntos o píxeles de la imagen que están dentro del área seleccionada.

Si se analizan selecciones múltiples, la opción más conveniente es emplear la herramienta *ROI Manager*. En este caso el procedimiento implica primero seleccionar las regiones de interés

(ROI) en la imagen digital. Las ROI se agregan al gestor con la tecla “T” o el botón *Add* (*Analyze* > *Tools* > *ROI Manager*). Posteriormente, se realiza la convolución RGB y finalmente, se mide con el botón *Measure* del *ROI Manager* en la imagen del canal elegido. Esta opción abre una tabla donde se muestra el número de selecciones con su respectiva área, y el valor promedio (*Mean*), mínimo (*Min*) y máximo (*Max*) de la intensidad de color. La intensidad de color en cada zona es representada como un valor entre 0 y 255, donde 0 es el color negro y 255 es el color blanco. Los valores comprendidos en este rango dependen del grado de saturación de cada tono. Esto significa que los valores cercanos a 255 tienen la mayor intensidad de color y los valores cercanos a 0 indican lo contrario.

En esta tesis doctoral, se ha utilizado el programa ImageJ con versión Java 8 y 64 bit para Windows, y se ha programado una macro para automatizar el análisis RGB de selecciones múltiples. La macro se ha creado en la opción *Plugins* > *Macro*. El procedimiento detallado para el tratamiento de las imágenes digitales con esta macro está descrito en el apartado de materiales y métodos del artículo al que está dedicado el capítulo 6. En la siguiente figura se muestra la ventana principal de ImageJ y las partes del programa mencionadas en esta sección:

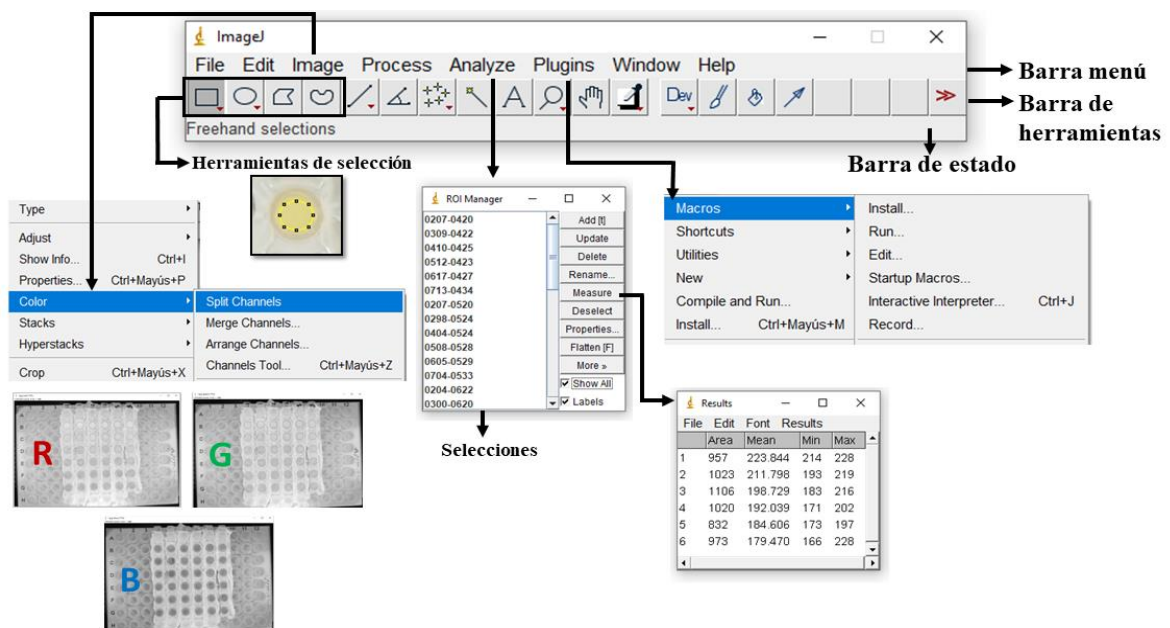


Figura 3.16. Ventana principal de ImageJ y sus herramientas.

### **3.5. Metodología de optimización experimental**

El proceso de optimización en química analítica se basa en un conjunto de pasos que tienen como fin encontrar las mejores condiciones en las que llevar a cabo un método analítico y se mide generalmente en términos de la reproducibilidad y sensibilidad de la respuesta analítica. Normalmente, la optimización se lleva a cabo de forma univariante, donde se estudia consecutivamente la influencia de un solo factor en la respuesta experimental mientras los otros factores permanecen constantes. La optimización univariante representa una metodología simple con resultados fáciles de interpretar, pero no permite conocer los factores con mayor influencia y las interacciones significativas entre ellos. De esta manera, una opción conveniente es realizar una optimización multivariante, en la que por medio de diseños estadísticos de experimentos se puede estudiar simultáneamente todos los factores y sus interacciones. Esta metodología permite obtener valores óptimos con mayor precisión y, en general, requiere un número mínimo de experimentos para su desarrollo.

En esta tesis doctoral, los trabajos descritos en los capítulos 4 y 5 han empleado una combinación de la optimización univariante con la multivariante. El diseño experimental y la evaluación de los resultados de la optimización multivariante se ha realizado con el programa Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, USA). En el resto de trabajos se ha utilizado una optimización univariante, haciendo una gráfica para cada variable. La selección del método de optimización se basó teniendo en cuenta la metodología seguida en trabajos publicados similares a los desarrollados en esta tesis. Esto también permitió establecer las variables fundamentales y los intervalos iniciales de trabajo (límites mínimos y máximos de cada factor) en los que se esperaba encontrar las condiciones óptimas. Dado que la optimización multivariante requiere un mayor grado de interpretación, a continuación, se explican los conceptos claves y la metodología seguida.

#### **3.5.1. Diseño experimental en la optimización multivariante**

El primer paso en la optimización multivariante consiste en identificar y seleccionar los factores (variables independientes) que potencialmente puedan afectar la respuesta (variable dependiente). El número de factores definidos en este paso determina el número de experimentos a ejecutar. Luego, se establece el dominio experimental (intervalo de trabajo) entre los niveles máximo y mínimo para cada uno de los factores seleccionados. Los factores y los niveles de trabajo se definen con base en los antecedentes del estudio.



Posteriormente, se elige un diseño experimental para llevar a cabo el cribado o *Screening* de los factores, es decir, una evaluación preliminar que tiene como fin determinar las variables e interacciones significativas en la respuesta. El diseño experimental consiste en un conjunto específico de experimentos, los cuales se definen por una matriz que combina los niveles de las variables en todas las opciones posibles. Normalmente, se emplea un diseño factorial de dos niveles (modelo lineal), de modo completo o fraccionado.

En un análisis completo, la cantidad de experimentos está determinada por la ecuación  $n=2^k$ , donde  $n$  es el número de experimentos y  $k$  es el número de factores. El análisis fraccionado permite una disminución del número de experimentos, que viene dado por la ecuación  $n=2^{k-x}$ , donde  $x$  se refiere al número de factores reducidos. La elección de trabajar con un diseño factorial completo o fraccionado depende de la cantidad de variables estudiadas, el número de experimentos resultantes y el criterio del analista. En esta tesis, se ha usado un diseño fraccionado en el caso del método descrito en el capítulo 4 y un diseño completo en el del capítulo 5.

En los diseños factoriales se pueden visualizar las posibles combinaciones de los factores en términos codificados, donde -1 se usa para el nivel inferior (valor mínimo del factor) y +1 para el nivel superior (valor máximo del factor). Además, la curvatura del diseño y disminuir el error experimental (error puro) se recomienda realizar tres repeticiones en el punto central ( $C_0$ ) con un valor codificado como cero. La siguiente figura es representativa de un diseño factorial de dos niveles con tres factores.

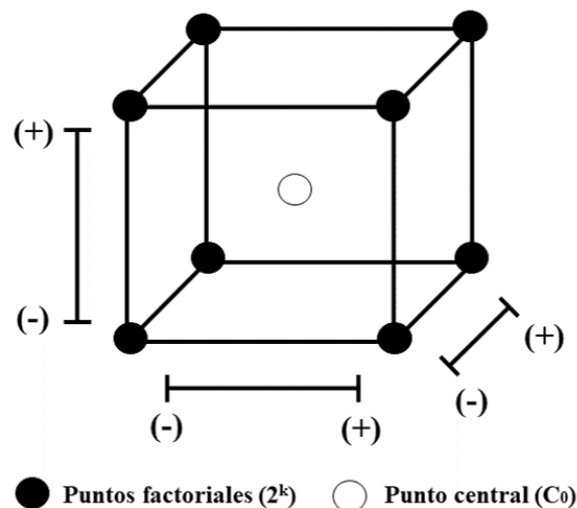


Figura 3.17. Esquema representativo de un diseño factorial completo  $2^3$ .

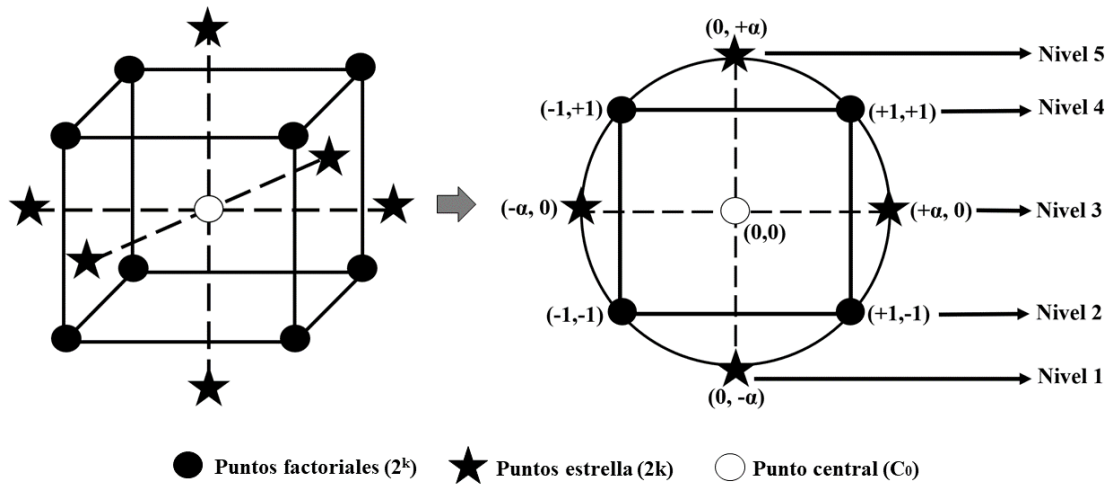
Los resultados del diseño factorial se pueden visualizar a través de un análisis de varianza (ANOVA) y un gráfico de Pareto. Por un lado, la ANOVA permite conocer cuáles son los factores e interacciones significativas. Si la hipótesis nula se rechaza ( $p < 0,05$ ), los factores son significativos y, si se acepta ( $p > 0,05$ ), no lo son. Por otro lado, el gráfico de Pareto muestra en forma de barras las variables e interacciones de mayor a menor importancia en la respuesta. En el diagrama, las barras que sobrepasan la línea de referencia (nivel de significancia,  $p = 0,05$ ) son factores estadísticamente significativos. El valor mostrado al lado de cada barra señala el valor estandarizado del efecto, y el signo del número (+/-) denota un aumento de la respuesta cuando el factor está cerca de su nivel superior o inferior. La significancia de la curvatura indica si existen variables que ofrezcan una respuesta crítica (máxima o mínima).

En general, si se presenta curvatura es necesario aplicar un diseño experimental de superficie de respuesta cuadrática a los factores significativos. Si no hay curvatura, el modelo cuadrático también se puede usar como un diseño complementario si lo que se desea es reestudiar los factores o explorar una zona donde se cree que pueda haber una configuración óptima. En el diseño cuadrático se puede reajustar el dominio experimental del diseño factorial y encontrar valores óptimos con gran precisión. Los modelos de superficie de respuesta más conocidos son el diseño factorial completo de tres niveles, el diseño central compuesto (DCC), la matriz Doehlert y el diseño de Box Behnken. En esta tesis se ha aplicado el DCC debido a que es un diseño que evalúa de forma rápida y completa (hasta 5 niveles) los factores de interés.

El DCC es la combinación de un diseño factorial ( $2^k$ ) y un diseño de estrella ( $2k + C_0$ ) compuesto por puntos axiales centrados en las caras ( $2k$ ) y réplicas en el punto central ( $C_0$ ). Este diseño tiene como resultado la ecuación:  $2^k + 2k + C_0$ , que indica el número total de experimentos.

El siguiente y último paso consiste en realizar una prueba de robustez donde se validan los puntos óptimos obtenidos del DCC. En esta prueba se realiza un diseño factorial en el que los valores óptimos se toman como puntos centrales [94,95].

La figura mostrada a continuación representa un diseño DCC con dos factores, el modelo que ha sido utilizado en los capítulos 4 y 5 de esta tesis.



**Figura 3.18.** Esquema representativo de un diseño central compuesto de dos factores. La posición de los puntos axiales ( $\alpha$ ) se calcula con la ecuación  $\alpha = 2^{(k-x)/4}$ .

### 3.5.1.1. Función sumatoria de respuestas normalizadas

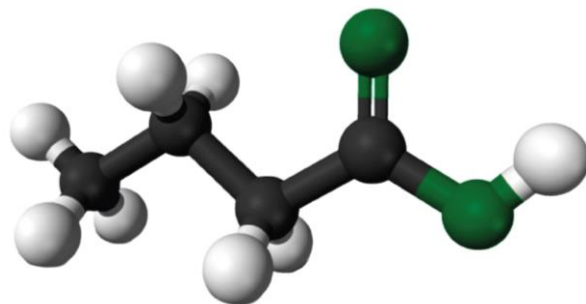
Para normalizar las respuestas (señal analítica o desviación estándar) se ha empleado una función de respuesta múltiple para la sumatoria de respuestas normalizadas (FSRN). Como su nombre lo dice, la FSRN consiste en normalizar las respuestas de cada analito para después realizar una sumatoria de todas ellas en cada experimento. Normalizar indica dividir la respuesta de cada analito (p.ej. área del pico) por el valor respuesta más grande obtenido para dicho analito en las condiciones de optimización estudiadas.



---

## CAPÍTULO 4

**Desarrollo de un método automatizado de microextracción líquido-líquido dispersiva en jeringa previo al análisis por GC-FID para la determinación de ácidos grasos volátiles en procesos anaerobios y aguas residuales**



## 4.1. Introducción

### 4.1.1. Generalidades de los ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos volátiles (AGV) comprenden un grupo de ácidos monocarboxílicos alifáticos con longitudes de cadena corta ( $C_2$ - $C_7$ ). Sus principales características son una baja volatilidad y alta polaridad. Se definen como ácidos volátiles porque son ácidos orgánicos solubles en agua que se pueden destilar a presión atmosférica. Se les denomina también con frecuencia ácidos grasos libres, porque pueden determinarse como formas no derivatizadas. También se les conoce como ácidos grasos de cadena corta, aunque este último término es el menos adecuado, ya que existen otros ácidos de cadena corta que no son volátiles. Entre los AGV se incluyen el ácido acético, propiónico, butírico, valérico, caproico y las formas isoméricas de estos tres últimos [96,97]. En la Tabla 4.1 se resumen las principales características de los AGV analizados en esta tesis.

Como se ha mencionado en la introducción, los AGV son metabolitos intermediarios originados por la conversión microbiana de las macromoléculas de la materia orgánica (carbohidratos, proteínas y grasas) durante las etapas de fermentación (acidogénesis y acetogénesis) de la DA. Por lo general, en un digestor se detectan concentraciones de entre 1 a 5000 mg L<sup>-1</sup> [18]. Las concentraciones altas de AGV (entre 1000 mg L<sup>-1</sup> y 4000 mg L<sup>-1</sup>) son las que conllevan la acidificación del medio del reactor anaerobio, deteriorando la producción de metano. Cabe decir que los AGV no solo se monitorizan en el digestor anaerobio, también se hace en las diferentes etapas del tratamiento de aguas residuales, incluyendo el afluente y el efluente residual [98–100].

En reactores altamente tamponados, la cuantificación de ácidos grasos volátiles (AGV) es un indicador más confiable de la inhibición que la medición de un pH bajo [18]. A pesar de ello, el contenido total de AGV (AGVT) no es suficiente para proporcionar información detallada sobre el funcionamiento del proceso, por lo que resulta de particular interés estudiar los componentes individuales de los AGV. Por lo general, los ácidos: acético ( $C_2$ ) y propiónico ( $C_3$ ), al estar presentes en concentraciones más altas, se utilizan como indicadores sensibles de la falla del digestor; p.ej., las altas concentraciones de ácido acético (>800 mg L<sup>-1</sup>) y las proporciones  $C_3/C_2 > 1.4$  son indicativas de una falla. Las concentraciones anómalas de los ácidos isobutírico y/o isovalérico (>5 mg L<sup>-1</sup>) también son considerados indicadores adecuados [96,101].

**Tabla 4.1.** Características generales de los AGV estudiados.

Nombre común	Acrónimo	Fórmula química	PM (g mol <sup>-1</sup> )	Densidad (g mL <sup>-1</sup> )	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad (g L <sup>-1</sup> ) *	pK <sub>a</sub>
Acético	C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	60,05	1,049	118	Completa	4,75
Propiónico	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	74,08	0,993	141	Completa	4,87
Isobutírico	iC <sub>4</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	0,950	154	210	4,85
n-butírico	C <sub>4</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	0,964	162	Completa	4,81
Iso-valérico	iC <sub>5</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102,13	0,926	176	20	4,78
n-valérico	C <sub>5</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102,13	0,939	185	40	4,82
Iso-caproico	iC <sub>6</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116,16	0,923	200	12	4,83
n-caproico	C <sub>6</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116,16	0,927	204	11	4,88

\* En agua a 20°C

[102]

#### 4.1.2. Antecedentes en el análisis de ácidos grasos volátiles

La preparación de las muestras previo al análisis de AGV incluye los procedimientos de limpieza, extracción, derivatización o la preconcentración de los analitos. La extracción de AGV se emplea principalmente para eliminar compuestos interferentes o para incrementar la concentración de los analitos cuando es necesario. Generalmente se usa la LLE con disolventes como éter dietílico, diclorometano (DCM) y metil *ter*-butil éter (MTBE) [99]. También se ha empleado la SPE para eliminar gran parte de la matriz de la muestra y la microextracción en fase sólida (SPME) combinada con la desorción directa en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases [103].

En cuanto a las técnicas de análisis, se destacan dos grupos:

Por una parte, están las técnicas que determinan solamente la concentración de AGV (expresada como equivalentes de ácido acético), entre las que se incluyen los procedimientos tradicionales basados en la destilación y titulación, y otros alternativos como la espectrofotometría (método colorimétrico de Montgomery y colaboradores [104]) y la fluorescencia. Estas técnicas son sencillas y económicas, pero conllevan procedimientos largos, laboriosos, poco sensibles e imprecisos [105]. Por otra parte, están los métodos instrumentales que usan técnicas de separación para la identificación individual de los AGV, tales como la GC, la LC, la cromatografía iónica

(IC) y la electroforesis capilar (CE). La LC requiere de la derivatización previa de los analitos para una detección por fluorescencia o por UV, mientras que la GC suele hacer uso del detector de ionización de llama (FID) o de la espectrometría de masas (MS), y los AGV se pueden derivatizar a metil-ésteres para aumentar su volatilidad [103].

A lo largo del tiempo, la derivatización se ha tratado de evitar siendo preferible la inyección acuosa directa (IAD) en columnas capilares especiales para la separación de ácidos grasos (p.ej. FFAP). Sin embargo, la IAD no es recomendable, debido a que puede afectar a la resolución de picos y provocar daños en el cromatógrafo y detector. Por esta razón, las técnicas de extracción siguen siendo fundamentales para la protección de la instrumentación [101,103].

Dentro de los métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales establecidos por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA), se incluyen tres determinaciones para la matriz acuosa (Método No. 5560, ácidos orgánicos y volátiles): destilación, cromatografía en columna y cromatografía de partición gas-líquido [10]. Entre estas, la destilación y la GC son las técnicas más usadas para cuantificar AGV en agua [96]. Recientemente, se han descrito métodos para la determinación automatizada de AGV con detección fluorimétrica, gracias a una derivatización cromogénica de los ácidos [106,107], así como métodos automatizados con IAD y microextracción líquida, mediante un análisis por GC-FID [108,109].

## 4.2. Resumen y discusión

En este capítulo se presenta un sistema automatizado para la extracción y preconcentración de seis ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico y ácido valérico) en muestras de reactores anaerobios y de agua residual.

Para el tratamiento de la muestra se ha desarrollado un sistema en flujo basado en la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva con agitación magnética asistida en jeringa (*in-syringe*-MSA-DLLME). Esta técnica se seleccionó debido a que posibilita una mezcla eficiente y homogénea del disolvente extractante con la muestra. Si bien se sabe que los métodos basados en DLLME son usados principalmente para preconcentrar analitos que están en concentraciones muy bajas ( $\text{ng L}^{-1}$  y  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), el método propuesto en este trabajo usa estratégicamente esta técnica con los objetivos de: a) transferir los analitos a una fase orgánica para reducir las interferencias de la matriz, b) evitar los problemas ocasionados por la IAD, y c) aprovechar las ventajas que ofrece la DLLME en términos ambientales y económicos, dado que se reduce el consumo de muestra y de disolvente orgánico (a escala de microlitros) con respecto a los métodos tradicionales de LLE.



En la configuración empleada para la automatización de la DLLME se ha incluido: una bureta automática, un dispositivo de agitación magnética, una válvula multiposición, una válvula solenoide y un muestreador automático. El método propuesto realiza de forma totalmente automatizada la toma de muestra, la extracción de los analitos, la deposición de la gota orgánica en viales y la limpieza del sistema. El tiempo total del procedimiento fue de 7 min, permitiendo tratar hasta 8 muestras por hora. Después del tratamiento, el extracto obtenido fue inyectado en un GC-FID para la cuantificación de los analitos. Para una separación adecuada de los ácidos grasos se utilizó una columna (DB-FFAP). El tiempo total de análisis fue de 11,5 min.

En este estudio se compararon algunos de los disolventes extractantes más empleados en la literatura para la extracción de AGV (DCM, MTBE y carbonato de dimetilo (CDM)), seleccionando finalmente MTBE, el disolvente más ecológico entre los estudiados. Se evaluaron también algunos dispersantes, aunque, finalmente, no se usó ninguno. Las razones están detalladas en la publicación. La dispersión, utilizando solamente la fuerza de la agitación, y el hecho de no usar un segundo disolvente (dispersante) hacen de éste un método más verde y económico.

Posteriormente, se llevó a cabo una optimización multivariante de las variables que afectan la extracción: volumen del extractante, tiempo de agitación, pH y concentración salina (NaCl). De los resultados, cabe destacar el efecto positivo de añadir sal a la muestra. Con el método optimizado se obtuvieron límites de detección (LDs) entre 0,1 y 1,3 mg L<sup>-1</sup> y una alta precisión (desviaciones estándar relativas (RSDs) entre 0,7 y 7 %).

El método se aplicó con éxito a muestras de sobrenadante (fase líquida superior) de dos procesos anaerobios (un digestor anaerobio y un reactor de fermentación) y a muestras de agua residual de la entrada y salida de la EDAR de Palma (Mallorca, España). El método propuesto demostró ser apto para medir las concentraciones típicas de un biodigestor, y se puede adaptar para detectar concentraciones más altas o más bajas que el intervalo de determinación fijado (desde el LD hasta 1 g L<sup>-1</sup>). De esta manera, se pueden cuantificar las altas concentraciones de un reactor productor de AGV (en escala de mg L<sup>-1</sup>), como el analizado en esta tesis, así como usarse para medir concentraciones bajas, usuales en aguas superficiales y lixiviados [105].

El método propuesto se comparó con otros métodos manuales y con el método de destilación indicado por la APHA. Con respecto a los primeros, el método desarrollado presenta las ventajas de la automatización de la DLLME, destacando esencialmente su precisión, rapidez y bajo consumo de disolvente. En relación al segundo, se ha demostrado, mediante diferentes modelos estadísticos, que no existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos por ambas metodologías.

Por último, al comparar el método propuesto con los métodos de automatización previamente mencionados [106–109], se ha encontrado que estos tienen una menor sensibilidad y/o inyectan la muestra directamente o una mezcla del disolvente orgánico con la muestra, sin separar las fases. Como ya se ha mencionado antes, la inyección directa de muestra puede tener efectos perjudiciales, especialmente, cuando se inyectan muestras con matrices tan complejas, como las analizadas en esta tesis. De esta manera, el método propuesto resulta más benéfico ya que obtiene un extracto limpio que protege el equipo. Cabe destacar que este es el primer método automatizado donde se lleva a cabo, conjuntamente, la extracción con la preconcentración de los AGV antes del análisis por GC.

### **4.3. Artículo original**

A continuación, se adjunta el artículo original: “Automated method for volatile fatty acids determination in anaerobic processes using in-syringe magnetic stirring assisted dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography with flame ionization detector” de M.A. Vargas-Muñoz, Víctor Cerdà, L.S. Cadavid-Rodríguez y Edwin Palacio, así como su material suplementario, publicado en *Journal of Chromatography A* 1643 (2021) 462034.

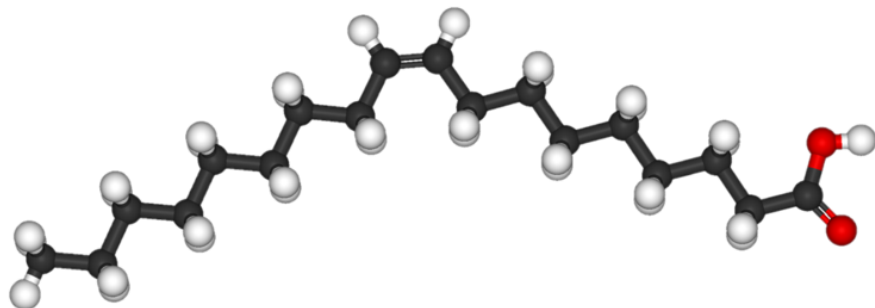
Enlace electrónico: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462034>



---

## CAPÍTULO 5

**Desarrollo de un sistema automatizado de microextracción líquido-líquido dispersiva en jeringa y un método GC-MS sin derivatización para la determinación de ácidos grasos de cadena larga en digestores anaerobios y aguas residuales de almazara**



## 5.1. Introducción

### 5.1.1. Generalidades de los ácidos grasos de cadena larga

A diferencia de los AGV, los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) contienen largas cadenas hidrocarbonadas (C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>) unidas al grupo ácido carboxílico. Los AGCL se denominan grasas y pueden ser saturadas o insaturadas. Ejemplos de ellos son los ácidos: mirístico (C<sub>14:0</sub>), palmítico (C<sub>16:0</sub>), esteárico (C<sub>18:0</sub>), oleico (C<sub>18:1</sub>) y linoleico (C<sub>18:2</sub>) [6]. En la Tabla 5.1 se resumen algunas características de los AGCL estudiados en esta tesis.

Los AGCL provienen de los afluentes ricos en grasas y aceites, como las aguas residuales de las industrias lácteas, petroquímicas, mataderos, pescaderías, cocinas o de las industrias alimentarias productoras de aceites y aceitunas (almazaras) [6,110]. Estos lípidos representan un serio problema para las EDARs, porque forman agregados insolubles que flotan sobre el agua residual, interfiriendo con la biodegradación y con las operaciones unitarias de los tratamientos de la planta [6].

**Tabla 5.1.** Características generales de los AGCL estudiados.

Nombre común	Acrónimo	Fórmula empírica	PM (g mol <sup>-1</sup> )	Densidad (g mL <sup>-1</sup> )	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad (g L <sup>-1</sup> ) *	pK <sub>a</sub>
Mirístico	C <sub>14:0</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228,38	0,862	326	20	8,1 - 8,2
Palmítico	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256,43	0,853	351	7	8,6 - 8,8
Esteárico	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284,50	0,941	361	3	10,15
Oleico	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282,47	0,895	360	Insoluble	9,85
Linoleico	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280,45	0,900	230	Insoluble	9,24

\* En agua a 20°C

[111–115]

En el proceso de DA, los AGCL se forman gracias a la hidrólisis de las grasas y se transforman en el ácido acético e hidrógeno que produce biogás [116]. Las aguas ricas en lípidos tienen un alto potencial de metano, pero pueden conllevar una acumulación de AGCL inhibiendo la metanogénesis. Esto se debe a que la adsorción de los AGCL en la pared celular y la membrana interrumpe el transporte metabólico de los microorganismos anaerobios [6,7]. Generalmente, concentraciones de AGCL totales superiores a 400 mg L<sup>-1</sup> conducen a la falla del digestor [117].

De manera específica, concentraciones de ácido linoleico, oleico y palmítico superiores a 30, 50-75 y 1000 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, son citadas como inhibitorias [118].

### 5.1.2. Antecedentes en el análisis de AGCL

Se han desarrollado varios métodos para la extracción y análisis de AGCL en muestras de agua. La preparación de la muestra involucra comúnmente el uso de la LLE y la SPE, para aislar los ácidos grasos de las muestras acuosas [119]. En el caso de la LLE, se ha descrito el uso de disolventes orgánicos como cloroformo (CF), metanol o una mezcla de ambos. Otros métodos incluyen una mezcla de hexano (Hx) y MTBE como alternativas al CF y DCM dadas sus propiedades cancerígenas [120]. Para la preparación de la muestra mediante SPE, se utiliza principalmente la resina C18 como adsorbente. Además, se han empleado técnicas miniaturizadas como la SPME y la LPME, y otras como la DLLME [121].

Al igual que para los AGV, las técnicas de separación más utilizadas en el caso de los AGCL incluyen GC, HPLC, IC y CE [122]. Los métodos basados en HPLC a menudo requieren fases móviles costosas y largos tiempos para equilibrar la columna [123,124]. Por ello, entre las técnicas de separación existentes, la GC es la comúnmente elegida debido a su rapidez y alta resolución. En cuanto a la detección, entre GC-MS y GC-FID, debido a una mayor sensibilidad y una más eficiente identificación de los correspondientes isómeros, la GC-MS es la opción preferida para el análisis de AGCL [119,124].

Con el fin de aumentar la volatilidad y disminuir la polaridad de los ácidos grasos para el análisis por GC, la mayoría de los métodos reportados requieren de la derivatización de los AGCL, mediante la formación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). No obstante, este paso de metilación requiere a menudo largos tiempos de reacción (de 1 a 16 h) y el uso de reactivos derivatizantes peligrosos [125]. Frente a esto, la aparición de las columnas FFAP, que también se usan para AGV, ha permitido la separación de AGCL no derivatizados con una resolución adecuada [123].

En cuanto a los métodos estándar de la APHA, los AGCL no se determinan individualmente, sino que se cuantifican dentro de una cantidad total de grasa y aceite. Para la extracción se recomienda una mezcla de 80% de Hx y 20% de MTBE. En el método 5520 (grasas y aceites) se presentan tres métodos para el análisis de muestras líquidas: el método gravimétrico de partición, el método infrarrojo de partición y el método Soxhlet [10].

## 5.2. Resumen y discusión

En este capítulo se presenta el desarrollo de un sistema automatizado *in-syringe*-MSA-DLLME para la extracción y preconcentración de cinco ácidos grasos de cadena larga (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico) en muestras de reactores anaerobios y de agua residual industrial.

El método aquí propuesto es similar al descrito en el capítulo anterior para la determinación de AGV, pero adaptado específicamente a los analitos objetivo de este capítulo. Este método también propone un sistema en flujo alternativo y usa GC-MS como instrumento de análisis para obtener una mejor sensibilidad y selectividad.

La configuración utilizada para la automatización incluye: un módulo multijeringa, un dispositivo de agitación magnética, un módulo de válvulas y un muestreador automático. En este caso se emplea una válvula de inyección en lugar de una válvula solenoide y con una segunda jeringa se propulsa el aire necesario para la inyección de la gota orgánica a los viales. El tiempo total del procedimiento fue de 10 min, permitiendo tratar hasta 6 muestras por hora. Tras el tratamiento, el extracto se inyectó en un GC-MS para la determinación de los analitos y se utilizó la misma columna DB-FFAP, empleada previamente para los AGV. El tiempo total de análisis fue de 13,3 min, logrando separar los ácidos grasos en menos de 9 min.

Como se puede observar en las Tablas 4.1 y 5.1, los AGCL tienen características diferentes a los AGV. Se destaca principalmente que los AGCL son poco o nada solubles en agua, a diferencia de los AGV. Dado que la solubilidad afecta directamente a las condiciones de extracción, la optimización de parámetros cambia y, por lo tanto, los factores de interés requieren ser estudiados en detalle.

Se estudiaron tres alcoholes (metanol, etanol e isopropanol) y sus porcentajes de mezcla con agua para encontrar un medio de disolución óptimo para analizar los AGCL en fase acuosa. A su vez, se evaluaron los cuatro disolventes extractantes más utilizados en la literatura para la extracción de este tipo de analitos (DCM, CF, Hx y Hx: MTBE (1:1)). Finalmente, se eligió una mezcla de etanol-agua (50% v/v) para disolver los analitos que también funcionó implícitamente como dispersante en la DLLME. Como extractante se seleccionó el hexano, un disolvente no carcinogénico [126] que, además, permitía una buena separación de las fases después de la agitación. También se optimizó cuidadosamente el pH a través de un análisis univariante.

Para el resto de variables que afectan la extracción: volumen del extractante, tiempo de agitación y concentración salina (NaCl), se llevó a cabo una optimización multivariante. Los

resultados indicaron que agregar sal afecta negativamente la extracción de los AGCL, lo que supone una diferencia respecto a lo encontrado para los AGV en el anterior capítulo.

Las figuras de mérito del método propuesto mostraron LDs entre 0,01 y 0,05 mg L<sup>-1</sup>, precisiones satisfactorias (RSDs entre 3,3 y 8 %) y una alta recuperación de la extracción (ER %) de los ácidos grasos menos polares (ácidos esteárico, oleico y linoleico). De hecho, para los AGCL se obtuvieron valores de ER mayores a los obtenidos para los AGV, lo que posiblemente es debido al efecto positivo del dispersante.

El método se aplicó exitosamente a muestras de sobrenadante de dos procesos anaerobios (un digestor anaerobio y un reactor de fermentación) y a muestras de agua residual de almazara procedentes del proceso de centrifugación y decantación de una industria productora de aceite de oliva (Mallorca, España). Las concentraciones de AGCL encontradas en todas las muestras sirvieron para describir el comportamiento inhibitorio de estas sustancias.

El método de automatización descrito en este trabajo es el primero desarrollado para la extracción y preconcentración de AGCL. La metodología propuesta tiene el beneficio adicional de no incluir un paso de derivatización, gracias al procedimiento utilizado para la DLLME y al uso de una columna resistente a altas temperaturas. El trabajo desarrollado para AGCL presenta también ventajas similares al método descrito para AGV. Es simple, rápido, preciso, económico y amigable con el ambiente, dado que: reduce el consumo de disolvente extractante, evita el consumo de reactivos de derivatización perjudiciales para la salud y el medio ambiente, y emplea cortos tiempos para el tratamiento de muestra y el análisis cromatográfico.

### 5.3. Artículo original

A continuación, se adjunta el artículo original (*paper in forefront*): “Determination of long-chain fatty acids in anaerobic digester supernatant and olive mil wastewater exploiting an in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization-free GC-MS method” de M.A. Vargas-Muñoz, Víctor Cerdà, Gemma Turnes Palomino y Edwin Palacio, así como su material suplementario, publicado en *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413 (2021) 3833-3845.

Enlace electrónico: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-021-03338-z>

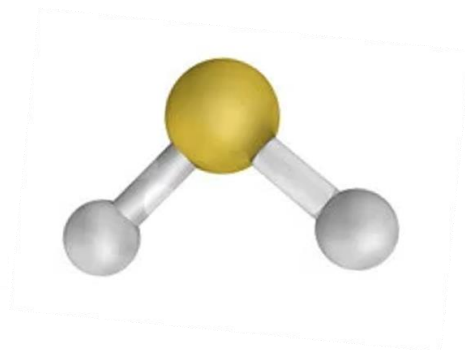
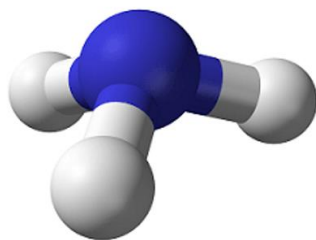




---

## CAPÍTULO 6

**Desarrollo de un método basado en sensores de papel y un sistema colorimétrico portable impreso en 3D para la detección de amoníaco y sulfuro en digestores anaerobios y aguas residuales**



## 6.1. Introducción

### 6.1.1. Generalidades del amoniaco

El amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) se produce por la biodegradación de la materia orgánica que contiene nitrógeno dentro de su composición (p.ej. urea y proteínas) [7]. Normalmente, se encuentra a bajas concentraciones en la naturaleza, pero las descargas de aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas contribuyen a un aumento de las concentraciones en el medio ambiente [127]. El amoniaco es un gas maloliente, incoloro, corrosivo y tóxico para la salud humana [128]. Cantidades abundantes de este nutriente (eutrofización) también conducen a la proliferación de algas, lo que conlleva a una disminución del oxígeno, con efectos tóxicos sobre los organismos acuáticos [127].

En lo que se refiere a la DA, el amoniaco es un nutriente importante para el crecimiento de los microorganismos. No obstante, a altas concentraciones puede actuar como inhibidor del tratamiento biológico. Durante la fermentación de los materiales ricos en nitrógeno, el nitrógeno amoniacal se libera principalmente en su forma ionizada (amonio,  $\text{NH}_4^+$ ). Sin embargo, un aumento del pH del medio acuoso que sobrepase su  $\text{pK}_a$  de 9,3, conduce a una forma no ionizada más tóxica ( $\text{NH}_3$ ). Es importante tener en cuenta que la concentración de amoniaco que puede inhibir el proceso varía dependiendo de si los microorganismos han sido previamente adaptados a la presencia de amoniaco. Los procesos que se han adaptado al amoniaco pueden inhibirse a concentraciones de  $800 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que los procesos no adaptados pueden verse ya afectados a concentraciones de entre  $100$  y  $150 \text{ mg L}^{-1}$  [6].

Son varios los mecanismos descritos para la inhibición por el amoniaco. Mientras el amonio ionizado inhibe exclusivamente la síntesis enzimática; el amoniaco, siendo más hidrofóbico que el amonio, es más tóxico porque se difunde fácilmente a través de la membrana. Dentro de la célula, el amoniaco se transforma en amonio, mediante captación de protones. Esto provoca un desequilibrio de los protones y como consecuencia de ello, ocurre un cambio en el pH intracelular. La necesidad de equilibrar este gasto de protones aumenta el consumo de potasio por parte de la célula, es decir, aumenta el requerimiento energético y se origina una deficiencia de potasio [6,7].

### 6.1.2. Antecedentes en el análisis de amoniaco

Entre los métodos más utilizados para la determinación de nitrógeno amoniacal se encuentran los métodos espectrofotométricos (o colorimétricos), fluorimétricos y electroquímicos.

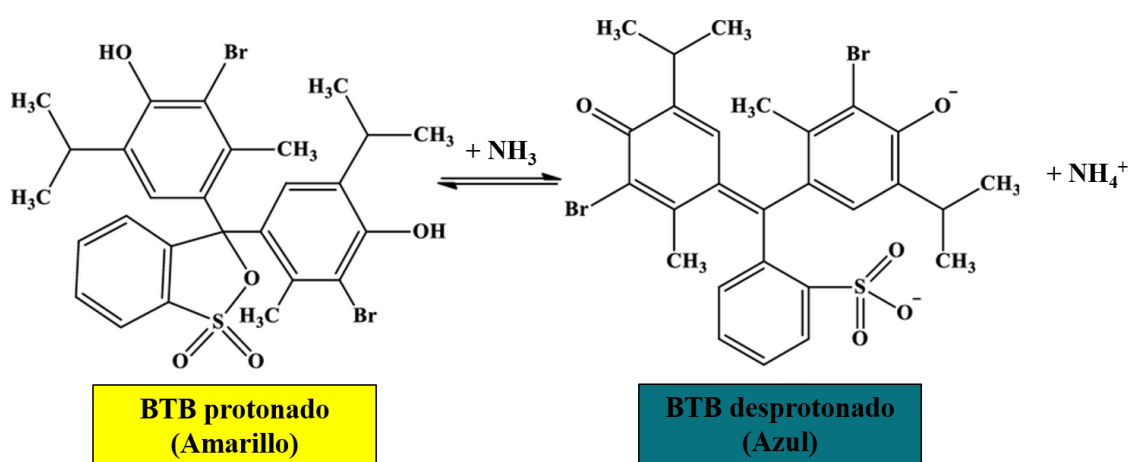
Los métodos espectrofotométricos más comúnmente utilizados son los propuestos por Nessler y Berthelot. El método de Nessler es más sencillo que el método de Berthelot, ya que usa un solo reactivo y no se requiere calentamiento. Sin embargo, el reactivo de Nessler (basado en mercurio) es tóxico y el método tiene interferencias por calcio, magnesio y otros iones. Por su parte, el método de Berthelot requiere de un catalizador (nitroprusiato) y temperaturas de reacción de 60 °C. Además, usa reactivos tóxicos (fenol alcalino e hipoclorito), que se han intentado reemplazar después por 1-naftol y dicloroisocianurato de sodio. Estos métodos se han automatizado mediante técnicas de análisis en flujo [129].

Otros métodos se basan en la determinación fluorimétrica del amoniaco, entre los que destaca el método basado en el uso de *orto*-ftaldialdehído (OPA) [129], orientado, principalmente, a la detección de amonio a niveles trazas en aguas naturales [127]. También se han reportado métodos electroquímicos, entre los que se incluyen los métodos conductímetros, potenciométricos, voltamétricos y amperométricos. En cuanto a los métodos de separación, se citan la IC y la CE [129].

Para eliminar las interferencias por parte de la matriz de las muestras, se han propuesto métodos basados en la difusión gaseosa (DG) y la pervaporación (PV). Su principio general consiste en la conversión de amonio en amoniaco en condiciones alcalinas y la posterior difusión del gas a través de una membrana hidrofóbica (típicamente cinta para tuberías de teflón (PTFE)) hacia una solución aceptora (reactivo de Nessler, de Berthelot, o con un indicador ácido-base (p.ej. azul de bromotimol – BTB, Figura 6.1)) [129]. La PV se diferencia de la DG por la presencia de un espacio de aire de volumen constante entre la muestra y la membrana. En esta técnica, no se necesita pretratar la muestra (filtrar o centrifugar) y se combina la evaporación con la difusión del gas a través de una membrana permeable, que separa el gas volátil de otras sustancias volátiles no permeables. También, se evita el deterioro de la membrana, ya que esta no entra en contacto con la muestra, evitando la obstrucción de los poros por sustancias orgánicas, salinas, tensioactivas o con partículas [127,129,130]. Ambas metodologías se han usado ampliamente en métodos de análisis en flujo, principalmente en las técnicas FIA y SIA, siendo la espectrofotometría, fluorimetría y conductimetría algunas de las técnicas más usadas para la detección [129,131]. En la literatura se reportan algunos de estos métodos para la determinación de amoniaco en aguas residuales [132–134]. En cuanto a los métodos *in-situ*, se han reportado varios basados en sensores de papel impregnados con indicadores (3-nitrofenol y BTB) [135], el

reactivo de Nessler [136], el reactivo de Berthelot [137], y una sustancia natural extraída de una flor [138].

Los métodos estándar APHA para la determinación de nitrógeno amoniacal (No. 4500-NH<sub>3</sub>) incluyen el método titulación, los métodos de electrodo selectivo de amoníaco, el método de fenato y dos versiones automatizadas de este último. Todos estos métodos a excepción de la titulación pueden usarse con o sin destilación de la muestra [10].



**Figura 6.1.** Mecanismo de reacción del indicador BTB en la detección de amoníaco. El cambio de color de BTB de amarillo a verde y/o azul ocurre con la protonación de amoníaco y la desprotonación de las moléculas de colorante en su intervalo de transición (pH 6.0–7.6) [139].

### 6.1.3. Generalidades del sulfuro

El sulfuro en forma de ácido hidrosulfúrico o sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) es generalmente conocido por su olor característico a huevos podridos. Es un gas incoloro, explosivo, inflamable y corrosivo. Tiene una solubilidad moderada en el agua y es un ácido débil con dos constantes de disociación. La primera reacción del sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S ⇌ H<sup>+</sup> + HS<sup>-</sup>) ocurre a un pK<sub>a</sub> 7,04 y se produce el ion de sulfuro de hidrógeno (HS<sup>-</sup>), mientras que la segunda reacción (HS<sup>-</sup> ⇌ H<sup>+</sup> + S<sup>-2</sup>) tiene lugar a pK<sub>a</sub> 11,89 y produce ion sulfuro (S<sup>-2</sup>). En medios acuosos en condiciones químicas no alteradas y con un pH cercano a la neutralidad, prevalecen disueltos el HS<sup>-</sup>, y la cantidad de S<sup>-2</sup> es insignificante [140].

El sulfuro de hidrógeno se genera naturalmente a partir de diversas fuentes (volcanes, manantiales, pantanos, petróleo, agua estancada, agua natural, etc.) y hace parte del ciclo biogeoquímico del azufre y de los metales pesados. En ambientes anóxicos, el sulfato se reduce

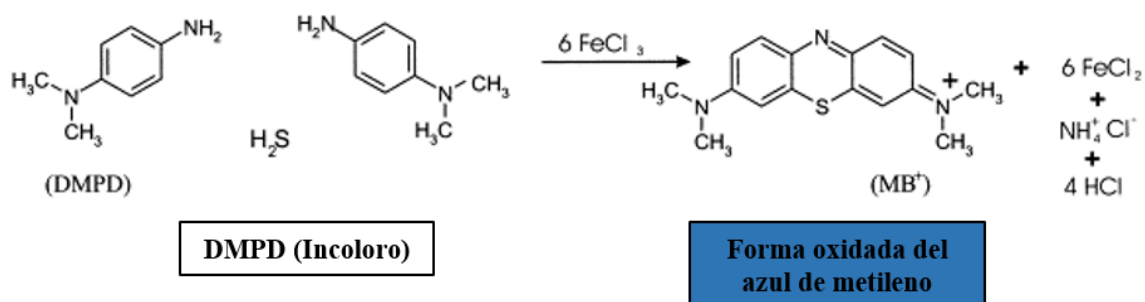
a sulfuro de hidrógeno y se forman sales insolubles de sulfuros metálicos. El sulfuro de hidrógeno también proviene de fuentes antropogénicas, originándose a partir de la descomposición de la materia orgánica presente en las aguas residuales de los alcantarillados municipales y de las EDARs. Se incluyen los efluentes de refinerías petroquímicas, curtiembres, granjas, las industrias del papel y de alimentos [140,141]. En las EDARs, el sulfuro de hidrógeno se asocia con la corrosión de las tuberías de metal y con un olor nauseabundo [142]. Además, una exposición prolongada a este gas tiene efectos neurotóxicos en humanos y animales [141]. La Comisión Europea ha establecido valores límites de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{S}$  para un turno de trabajo de 8 h, mientras para un período de corta duración se ha fijado en  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{S}$  [143].

En el tratamiento anaeróbico de las aguas residuales, el sulfuro de hidrógeno se origina a partir de la reducción de las aguas residuales que contienen sulfato, gracias a la acción de las bacterias sulfato-reductoras (BSR). Existen dos tipos de inhibición por sulfuro: la inhibición primaria, debida a la competencia por los sustratos (acetato, carbono e hidrógeno) entre las BSR y las arqueas metanogénicas, y la inhibición secundaria, debida a la toxicidad generada por los sulfuros solubles sobre la función celular de las arqueas metanogénicas y de las mismas BSR. Ambos tipos de inhibición desencadenan una disminución en la producción de metano y afectan la eficiencia del tratamiento del agua residual. En la literatura se describen concentraciones inhibitorias desde los 100 a los 800  $\text{mg L}^{-1}$  de sulfuro disuelto, y de 50  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{S}$  en el caso de microorganismos metanogénicos no aclimatados [6,7].

#### **6.1.4. Antecedentes en el análisis de sulfuro**

La determinación de sulfuro incluye técnicas analíticas como la espectroscopía, la electroquímica, la cromatografía y combinaciones de las mismas.

La espectroscopía es la técnica más usada para la determinación de sulfuro y el método más común es la prueba de azul de metileno (reacción de Fisher), un método que, a pesar de ser antiguo, sigue siendo muy simple y selectivo. La reacción colorimétrica de Fisher (Figura 6.2) involucra la reacción del sulfuro con N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) en presencia de iones de hierro (cloruro de hierro) como agente oxidante. La reacción produce un color azul característico, que corresponde a la formación del colorante tiazina heterocíclico, más conocido como azul de metileno (MB). La intensidad del color final es medida a 660-670 nm por espectrofotometría y es directamente proporcional a la cantidad de sulfuro en la muestra original.



**Figura 6.2.** Reacción colorimétrica de Fisher [144].

Entre las técnicas electroquímicas, destacan las potenciométricas, galvánicas y amperométricas. Estas técnicas tienen una amplia aplicabilidad en la detección portable del sulfuro y son especialmente útiles para analizar muestras coloreadas. Sin embargo, tienen como limitantes: los largos tiempos de respuesta, la contaminación del electrodo, el taponamiento de las membranas y, las interferencias con tioles y otros aniones de azufre.

En comparación con las anteriores técnicas, la cromatografía (GC y HPLC), en conjunto con la detección conductimétrica, fotométrica y fluorimétrica, ofrece ventajas significativas al permitir separar el sulfuro de los interferentes. Sin embargo, son técnicas que requieren de una instrumentación más robusta [145].

En la automatización del análisis de sulfuro a través de sistemas de análisis en flujo destacan los sistemas SIA, FIA y MSFIA, en combinación con sistemas de detección espectrofotométricos, espectroscópicos y electroquímicos. La volatilidad del sulfuro también se ha aprovechado para usar separadores gas-líquido basados en membranas (DG, PV y diálisis), mediante la acidificación de la solución de la muestra que genera  $\text{H}_2\text{S}$  [146], también en la determinación de sulfuro en aguas residuales [147–149]. Además, el concepto de DG se ha extendido a la fabricación de sensores de papel para la determinación de sulfuro en muestras de agua. Las metodologías incluyen el uso de papeles impregnados principalmente con los reactivos del método del azul de metileno [137,144] y sales metálicas [150,151].

En cuanto a los métodos estándar APHA para la determinación de sulfuro, el método 4500- $\text{S}^{2-}$  abarca dos tipos de ensayos. Por un lado, métodos cualitativos que incluyen la prueba de antimonio, el electrodo de plata-sulfuro de plata y, las pruebas del papel de acetato de plomo y lámina de plata. Y, por otro lado, métodos cuantitativos como el método azul de metileno, un método automatizado de la prueba anterior (junto con una diálisis gaseosa), el método yodométrico, el método del electrodo del ion selectivo y un método de destilación [10].

## 6.2. Resumen y discusión

En este capítulo se presenta un método basado en sensores de papel y un sistema colorimétrico portable impreso en 3D para la determinación de amoniac y sulfuro en digestores anaerobios y aguas residuales.

El método propuesto incluye dos partes: a) un sistema de preparación de muestra, que usa una microplaca de 96 pocillos y sensores de papel, y b) un sistema para la detección colorimétrica, que emplea un teléfono inteligente y una caja impresa en 3D. El procedimiento se basa en la PV y DG de amoniac y sulfuro sobre sensores de papel impregnados con reactivos específicos para cada analito (indicador BTB o reactivos del método de azul de metileno). Como barrera hidrofóbica, se han puesto cintas de PTFE entre las muestras y las tiras de papel sensor. Dependiendo del compuesto, para la generación del gas se ha usado una solución alcalina (hidróxido de sodio - NaOH) o una solución ácida (ácido clorhídrico - HCl).

La caja de luz para fotografía se empleó para mantener fijas las condiciones de iluminación y la posición de la microplaca. La caja se diseñó con el programa Rhinoceros y se imprimió utilizando la técnica de FDM. Para la iluminación se usaron placas de luz LED alimentadas por una pequeña batería portátil. Las fotos que se capturaron, a los 5 min para amoniac y a los 30 min para sulfuro, fueron analizadas de manera rápida y autónoma a través de una macro programada en ImageJ.

Se llevó a cabo una optimización de los parámetros que afectan la sensibilidad y la precisión analítica. Primero, se estudiaron los parámetros operacionales de la caja de luz: distancia entre el teléfono inteligente y la microplaca, y la intensidad y posición de la luz. Los resultados han mostrado que la colocación de placas LED en todas las caras laterales de la caja permite una distribución uniforme de la luz en la captura de las imágenes.

Posteriormente, se estudiaron los parámetros que afectan la determinación de los analitos: concentración del indicador, volumen de muestra, tiempo para la detección, y volumen y concentración de las soluciones de NaOH y HCl. También, se estudió la estabilidad de los sensores de papel en función del tiempo. Los resultados obtenidos para el amoniac indicaron que una alta concentración de BTB mejora su sensibilidad. Mientras que, para el sulfuro, la optimización del porcentaje de DMPD fue clave para obtener una alta sensibilidad y una buena linealidad.

Con el método optimizado se obtuvieron LDs de  $1,3 \text{ mg L}^{-1}$  y  $1,7 \text{ mg L}^{-1}$  para amoniac y sulfuro, respectivamente. Las precisiones (RSDs) obtenidas al analizar múltiples dispositivos (microplacas con sensores de papel) fueron menores al 8 %.



El método se aplicó satisfactoriamente a muestras procedentes de distintos puntos de la EDAR de Calvià (Mallorca, España): sobrenadante del digester anaerobio y agua residual de entrada y de salida. Las concentraciones de amoniac detectadas permitieron describir el comportamiento típico de esta sustancia en una depuradora. Los resultados del análisis de muestras se compararon con los obtenidos por los métodos estándar, y adicionalmente, las muestras se enriquecieron con concentraciones de analito conocidas para validar la exactitud de la metodología propuesta.

El método propuesto, basado en la pervaporación y difusión gaseosa, ha demostrado ser especialmente interesante para su aplicación en el análisis de muestras coloreadas y con partículas. Así mismo, la separación de los sensores en la microplaca favorece el análisis multimuestra y multiparámetro. Como ventajas adicionales cabe destacar el bajo consumo de reactivos y muestras, la portabilidad del sistema, una preparación simple del sistema sensor y la rapidez del análisis RGB de las imágenes digitales.

### **6.3. Artículo original**

A continuación, se adjunta el artículo original: “Paper sensor-based method using a portable 3D-printed platform and smartphone-assisted colorimetric detection for ammonia and sulfide monitoring in anaerobic digesters and wastewater” de M.A. Vargas-Muñoz, Julián Morales, Víctor Cerdà, Laura Ferrer y Edwin Palacio, así como su material suplementario, publicado en *Microchemical Journal* 188 (2023) 108469.

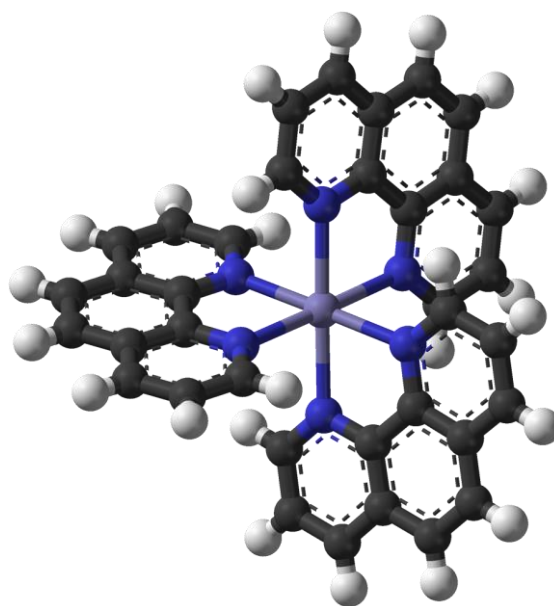
Enlace electrónico: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108469>



---

## CAPÍTULO 7

**Desarrollo de un método de extracción en fase sólida y un sistema espectrofotométrico portable impreso en 3D para la preconcentración y análisis de hierro en diferentes tipos de muestras de agua**



## 7.1. Introducción

### 7.1.1. Generalidades del hierro

El hierro (Fe) es el metal de transición más abundante en la Tierra y es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos. Este metal juega un papel importante en el transporte de electrones y, por lo tanto, en los procesos metabólicos. El hierro posee dos estados de oxidación que dependen de las condiciones de oxígeno. Se puede encontrar en su forma elemental, mineral e iónica. Dependiendo de las condiciones de oxígeno, el hierro está en estado férrico (Fe (III)) en ambientes óxicos y en estado ferroso (Fe (II)) en ambientes anóxicos [152].

Debido al abundante uso de este metal en la industria, la contaminación de las aguas por hierro es importante. Se ha reportado que un arrastre de lixiviados en el mayor vertedero de Mallorca (España) llegó a contaminar acuíferos cercanos con metales pesados, siendo el hierro el metal más encontrado en los pozos de agua subterránea durante cinco años (2015-2019) [153]. Se conoce que este metal puede afectar las propiedades organolépticas del agua. Además, la ingestión de altos niveles de hierro puede aumentar el riesgo de padecer cáncer, artritis, diabetes, enfermedades cardíacas, endocrinas y hepáticas. En consecuencia, la Comisión Europa ha fijado un nivel máximo de este contaminante en  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  para aguas destinadas al consumo humano [154].

El hierro también se encuentra en cantidades considerables en las aguas residuales (procedente de la industria metalúrgica, la minería, la fabricación de vidrio y cerámica, etc.). Se ha informado que la concentración promedio en una EDAR está en más de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras en el efluente de una planta se pueden encontrar hasta  $2 \text{ mg L}^{-1}$  [152]. A diferencia de las otras sustancias tóxicas evaluadas en esta tesis, el hierro no es biodegradable y tiende a acumularse en concentraciones potencialmente tóxicas en los tratamientos biológicos [6]. Si bien, el hierro tiene un importante papel nutricional en los microorganismos, en cantidades excesivas ( $> 20 \text{ mg L}^{-1}$ ) puede conllevar a la falla del digestor. La presencia de hierro puede producir estrés oxidativo y alterar la síntesis metabólica de los procesos bioquímicos de la DA. También se ha descrito la competencia por los sustratos entre las bacterias reductoras de hierro (BRH) y los metanógenos [152].

### 7.1.2. Antecedentes en el análisis de hierro

El hierro y otros metales se pueden determinar mediante técnicas basadas en la espectrometría como: la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (GF-AAS), espectrometría de absorción atómica electrotermica

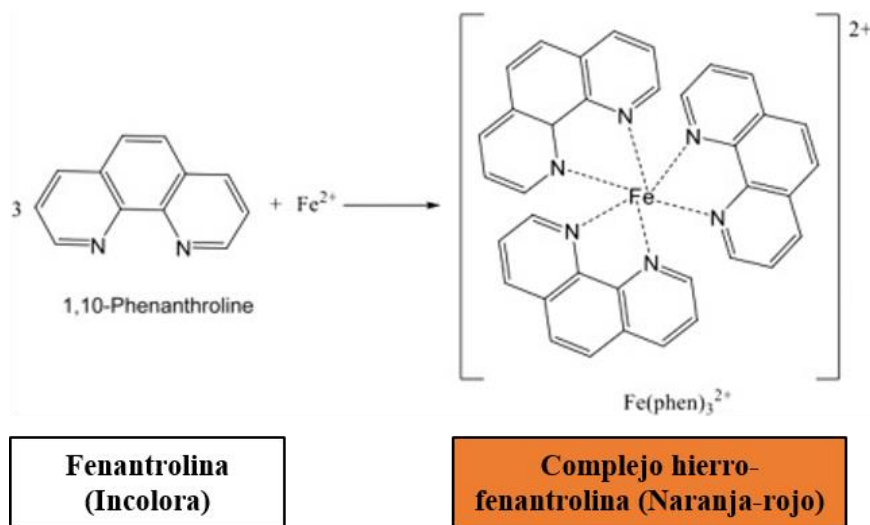
(ETAAS), espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES) o espectrometría de masas (ICP-MS) con plasma acoplado inductivamente [155]. Estas dos últimas técnicas son las más usadas debido a su alta sensibilidad y análisis rápido [156]. No obstante, a pesar de su buen rendimiento analítico, tienen una instrumentación costosa, procedimientos experimentales complejos y requieren de un mínimo de infraestructura y personal especializado [157].

La espectroscopia UV-Vis se suele utilizar como alternativa a las anteriores técnicas, ya que es más sencilla, tiene bajos costos de adquisición y mantenimiento, además de una buena frecuencia analítica y alta precisión. Sin embargo, esta técnica carece de la sensibilidad necesaria para determinar el hierro a niveles trazas, por lo que es necesario realizar un paso de preconcentración de la muestra antes del análisis. Los métodos de preconcentración incluyen la LLE, la SPE, la coprecipitación, la quelación de resinas y el intercambio iónico [155,156]. En el caso de la SPE se han usado principalmente resinas de intercambio iónico como Dowex y Chelex-100 [155,158].

Entre los métodos espectrofotométricos se destacan los métodos de la fenantrolina y el tiocianato. Ambas metodologías están enfocadas a la cuantificación de Fe (II) y Fe (III) a niveles trazas, seguida de la determinación de hierro total después de la reducción u oxidación de una de las especies. De manera específica, el método de la fenantrolina consiste en la reacción de la fenantrolina con el Fe (II) para formar un complejo de color naranja a rojizo (ferroína) que se mide a 510 nm (Figura 7.1). El hierro total puede ser determinado mediante la reducción de Fe (III) a Fe (II) con hidroxilamina, y la diferencia entre hierro total y Fe (II), permite calcular el Fe (III). Para la determinación espectrofotométrica del hierro también se han empleado batofenantrolina, ferrocina, piridina y otros reactivos orgánicos acomplejantes de la fenantrolina y el tiocianato [10,155].

También se ha hecho uso de las técnicas de inyección en flujo para la determinación de hierro, siendo la espectrofotometría y la quimioluminiscencia los principales sistemas de detección utilizados [155]. Recientemente, se ha publicado un trabajo en el que se hace uso de la SPE automatizada mediante un MSFIA para la especiación de hierro, y de un detector espectrofotométrico CCD que usa un LED como fuente de luz para su detección [159].

Otras técnicas menos utilizadas para la determinación de hierro, incluyen la cromatografía, la voltamperometría, la electroquímica, la fluorimetría y la quimioluminiscencia [155]. En referencia a los métodos estándar de la APHA, se incluyen el método de la fenantrolina (3500-Fe) y los métodos espectrométricos FAAS (3111B), ICP (3120C) y ETAAS (3113B) [10].



**Figura 7.1.** Formación del complejo de ferroína [160].

## 7.2. Resumen y discusión

En este capítulo se describe el desarrollo y optimización de un método para analizar hierro en campo. El método emplea un sistema espectrofotométrico miniaturizado y un procedimiento simple para la extracción y preconcentración de hierro.

El sistema de detección consta de cuatro partes: a) un pequeño espectrofotómetro CCD, b) una fuente de luz LED, c) soportes impresos en 3D para la fuente de luz y la cubeta, y d) un ordenador portátil. Tanto el detector como la fuente de luz se alimenta a través de las salidas USB del ordenador, haciendo posible un sistema portátil y práctico para ser utilizado en mediciones *in-situ*.

Se probaron dos espectrofotómetros (USB4000 y STS-VIS), dos LED de 5 mm (emisión de luz blanca y verde) y dos cubetas diferentes (una cubeta tradicional y una microcubeta). La luz verde monocromática se seleccionó de acuerdo a la longitud de onda de máxima absorbancia del analito (510 nm). Para hacer el sistema más económico, se imprimió en 3D una carcasa a medida para almacenar el LED y un circuito electrónico, que permitía controlar con precisión la intensidad de la luz.

Para la extracción en fase sólida y la preconcentración del hierro (Fe (III)) se utilizó una columna miniatura rellena con resina Chelex-100. El eluato del procedimiento SPE se usó para determinar las concentraciones de hierro con el método de la fenantrolina. La determinación del

hierro total y de las especies de hierro (Fe (II) y Fe (III)) se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en la introducción de este capítulo.

En la optimización de parámetros, se estudió el pH, el volumen de muestra y el tipo, concentración y volumen del eluyente. En condiciones óptimas, se alcanzaron un LD de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  y precisiones (RSDs) inferiores al 10 %. El método se aplicó para el análisis de distintas muestras de agua: agua de grifo, agua de mar, agua de pozo, un lixiviado y una muestra del sobrenadante de un biodigestor. Las recuperaciones, tras añadir analito a las muestras, variaron en un intervalo entre el 95 y el 102 %. Para la validación del método también se analizó un material certificado de agua de río y se compararon los resultados de algunas muestras con los obtenidos mediante ICP-OES.

El método propuesto en este capítulo representa una excelente alternativa para realizar determinaciones sensibles de hierro en campo sin la necesidad de usar instrumentos costosos. Si bien el método presentado en el anterior capítulo es más económico, el método descrito en éste permite una medición más sensible y precisa debido al uso de un espectrofotómetro.

### **7.3. Artículo original**

A continuación, se adjunta el artículo original: “Field-deployable method for iron analysis using a simple preconcentration procedure and a 3D portable spectrophotometric system” de M.A. Vargas-Muñoz, Kaewta Danchana, Víctor Cerdà y Edwin Palacio, así como su material suplementario, publicado en *Microchemical Journal* 170 (2021) 106774.

Enlace electrónico: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106774>

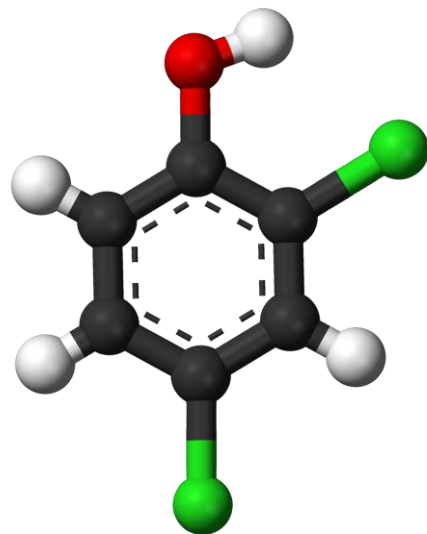




---

## CAPÍTULO 8

**Desarrollo de un agitador portable impreso en 3D con paletas recubiertas de una red metal-orgánica para la extracción *in-situ* de compuestos fenólicos en biodigestores y aguas residuales**



## 8.1. Introducción

### 8.1.1. Generalidades de los fenoles

Los fenoles son compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo hidroxilo (OH) unido a uno o más anillos aromáticos. El miembro más simple de esta categoría es el fenol o hidroxibenceno. El resto de compuestos derivados del fenol (compuestos fenólicos) se pueden clasificar de acuerdo a factores estructurales, como el número de unidades fenólicas dentro del compuesto o los grupos funcionales sustituidos en el anillo bencénico [161].

Por una parte, los fenoles se pueden encontrar de forma natural en el ambiente, ya que son producto de la descomposición de la materia orgánica en presencia de agua o son producto del metabolismo de plantas, animales y otros seres vivos. Por otra parte, proceden de las descargas de las actividades industriales, agrícolas, domésticas y municipales, que contribuyen a la contaminación del agua [162].

Actividades industriales como la producción de papel, la destilación de la madera y la desinfección de agua, pueden dar como resultado la formación de clorofenoles [161], un grupo de sustancias formadas por la adición de cloro al fenol. Este grupo de compuestos también pueden provenir de pesticidas, herbicidas, insecticidas, fungicidas, antisépticos, petroquímicos, pinturas, conservantes de la madera, cuero, pegamento y textiles. Se incluyen cinco tipos de clorofenoles: los monoclorofenoles (CPs), los diclorofenoles (DCPs), los triclorofenoles (TCPs), los tetraclorofenoles (TeCPs) y el pentaclorofenol (PCP) [6]. Otros compuestos fenólicos como los nitrofenoles (NPs), se originan por la radiación UV de agua que contiene nitrito y fenol [161]. Por su parte, el Bisfenol A o BPA (2,2-bis (4-hidroxifenil) propano) proviene de materiales plásticos, policarbonatos y resinas epoxi [161], y en las aguas residuales procede, principalmente, de la lixiviación de microplásticos de policloruro de vinilo (PVC) [163]. En medios acuáticos, estos compuestos químicos se pueden transformar en subproductos más o menos peligrosos (p.ej. la biodegradación de PCP produce 2-CP y 2,4-DCP) [162].

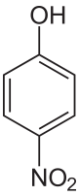
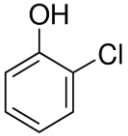
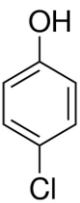
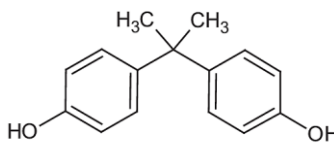
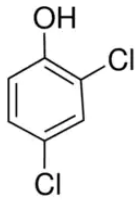
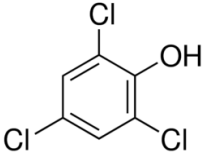
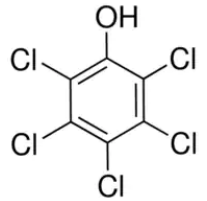
Los compuestos fenólicos descargados en el medio ambiente suponen un riesgo para todos los organismos vivos, ya que tienden a ser persistentes y bioacumulables. En humanos y animales tienen efectos tóxicos, causando cáncer y daños hepáticos [161]. Estas sustancias también dan un olor y sabor desagradable al agua. Por lo tanto, algunos clorofenoles y nitrofenoles han sido catalogados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y por la Unión Europea. La USEPA ha establecido límites permisibles de concentración de fenoles en la superficie del agua de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Mientras tanto, la UE ha fijado un límite permisible de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  en aguas superficiales y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  para el sistema de

alcantarillado [164]. Aunque el BPA no es considerada una sustancia prioritaria, sí ha sido incluida en la lista de sustancias candidatas de la REACH (Reglamento de Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas) debido a que es un reconocido disruptor endocrino, con efectos tóxicos en la reproducción y el desarrollo [165].

En los sistemas anaerobios, los fenoles son biodegradables, pero inhiben el proceso biológico. Los fenoles al ser hidrofóbicos entran fácilmente en los microorganismos, causando distintos efectos tóxicos. Los clorofenoles perturban el gradiente de protones de la membrana y la producción de energía de los microorganismos. Los nitrofenoles interfieren en la actividad enzimática y en las rutas metabólicas. El BPA provoca la ruptura de la pared celular e inhibe enzimas claves. Generalmente, la toxicidad de los fenoles se incrementa con el número de carbonos sustituidos y la posición que el grupo cloro o nitro ocupan en el anillo. De esta manera, el 4-NP y el PCP son respectivamente el nitrofenol y clorofenol más tóxicos [6,7,166]. Las concentraciones inhibitorias para cada compuesto fenólico se detallan en el artículo incluido en este capítulo.

En la siguiente tabla se muestran algunas características químicas de los fenoles estudiados en esta tesis. El logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua ( $\text{Log } K_{ow}$ ) se puede usar como un indicador de hidrofobicidad de los compuestos fenólicos y se correlaciona con la toxicidad de estas sustancias inhibidoras.

**Tabla 8.1.** Características generales de los fenoles estudiados.

Nombre	Acrónimo	Estructura química	PM (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidad (g L <sup>-1</sup> ) *	pK <sub>a</sub>	Log K <sub>ow</sub>
4-nitrofenol	4-NP		139,11	11,6	7,16	1,91
2-clorofenol	2-CP		128,56	28	8,56	2,15
4-clorofenol	4-CP		128,56	27	9,41	2,39
Bisfenol A	BPA		228,29	0.3	9,6	4,04
2,4-diclorofenol	2,4-DCP		163	4,5	7,9	3,06
2,4,6-triclorofenol	2,4,6-TCP		197,45	0,4	6,15	3,69
Pentaclorofenol 1	PCP		266,34	0,01	4,7	5,02

\* En agua a 20°C

[167-169]

### 8.1.2. Antecedentes en el análisis de fenoles

Las técnicas analíticas comúnmente utilizadas para la separación y determinación de fenoles son la cromatografía HPLC y la CE en combinación con la detección UV, electroquímica o MS. La LC se realiza generalmente adicionando ácidos o tampones a la fase móvil, con el fin de suprimir tanto la ionización de los fenoles como de los silanoles residuales de la fase estacionaria de la columna y así, evitar problemas en la retención y separación de los analitos. Igualmente, se ha empleado la GC con detección FID, por captura de electrones (ECD) o con MS, aunque en este caso, se sugiere un paso de derivatización que disminuya la polaridad de los fenoles y, por lo tanto, los picos con colas anchas [170]. También se han reportado métodos espectrofotométricos para la determinación de fenoles, pero son menos usados debido a sus problemas de sensibilidad, selectividad y lentitud [171].

Para alcanzar los límites de detección impuestos por los organismos de legislación ambiental mencionados anteriormente, suele ser necesario el pretratamiento de las muestras con técnicas de extracción/preconcentración. Las técnicas más usadas y, además, recomendadas por la USEPA son la GC con LLE y SPE. Mientras tanto, los métodos estándar APHA proponen la GC con LLE y detectores como FID, ECD y MS [10,170].

Entre las dos técnicas de extracción anteriormente mencionadas, existe una tendencia creciente a usar más la SPE que la LLE [172,173], ya que el consumo de disolventes orgánicos es menor. Los adsorbentes más comunes para SPE incluyen columnas C18, resinas poliméricas de poliestireno y cartuchos OASIS (adsorbente a base de N-vinilpirrolidano-divinilbenceno) [170]. Estas metodologías también se han extendido a su versión miniaturizada con el desarrollo de métodos DLLME [174] y SPME [175], aplicados tanto de manera manual como en sistemas automatizados [176]. Otra técnica empleada es la extracción por sorción con barra agitadora (SBSE), usando como adsorbentes polímeros como el polidimetilsiloxano (PDMS) [177]. Finalmente, también se han publicado algunos trabajos sobre el potencial de los MOF para la extracción de fenoles [178,179].

## 8.2. Resumen y discusión

En este capítulo se propone una plataforma portátil para la extracción *in-situ* de siete compuestos fenólicos (4-NP, 2-CP, 4-CP-2,4-DCP, 2,4,6-TCP, PCP y BPA) en muestras de agua residual y de sobrenadante de biodigestores. La plataforma integra un agitador de paletas impreso en 3D recubierto con una red metal-orgánica para la extracción y preconcentración de los analitos antes de su análisis por HPLC-DAD. El sistema presentado realiza simultáneamente el muestreo y la extracción (SPE) de los analitos, evitando el transporte de muestras al laboratorio.

El sistema propuesto se compone de: a) un dispositivo de agitación, b) un motor eléctrico, c) una batería portátil, y d) un recipiente que contiene la muestra. El dispositivo de agitación es un agitador que se ha impreso en 3D con la técnica de estereolitografía. El agitador contiene tres paletas removibles recubiertas del MOF MIL-100(Fe) y está unido a un motor que es alimentado por una batería portátil. Cuando el agitador se sumerge en la muestra, el motor se enciende por un tiempo determinado para extraer los fenoles. Posteriormente, las paletas se transportan al laboratorio y se realiza la desorción de los analitos. Para la determinación de los fenoles se utilizó un HPLC-DAD con una columna C18. El tiempo total de análisis fue de 30 min.

La caracterización mediante XRD, SEM y adsorción/desorción de N<sub>2</sub> demostró la obtención de un MOF MIL-100(Fe), de acuerdo con los datos reportados en bibliografía. El MIL-100(Fe) obtenido presentaba microporosidad y mesoporosidad, un área superficial de 1455 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>, un volumen de poro de 0,7 cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup> y morfología octaédrica.

Para seleccionar la técnica de inmovilización más adecuada del MOF, se evaluaron las técnicas: *stick & cure*, pos-impresión y una combinación de ambas. Los resultados indicaron que la combinación de ambas técnicas permite una mejor extracción debido posiblemente a la mayor cantidad de material retenido en las paletas.

Después, se llevó a cabo la optimización de los procesos de agitación y extracción. En el primer caso se estudió la geometría del agitador (diseño axial y radial), la profundidad de muestreo y la velocidad de la agitación. En cuanto a la extracción, se optimizó el volumen de muestra, el disolvente utilizado para la desorción, el tiempo de desorción y de extracción, el pH y la concentración de NaCl (fuerza iónica). También se estudió la reciclabilidad de las piezas y, la estabilidad de las paletas muestreadoras en función del tiempo y de la temperatura.

La extracción favorable de los analitos se atribuyó principalmente a las interacciones hidrofóbicas y  $\pi$ - $\pi$  entre los fenoles y el MOF, así como a una transferencia de masa mejorada

asociada con la velocidad de agitación y la forma del agitador. Además, no fue necesario ajustar el pH y la fuerza iónica, lo que simplificó el procedimiento de trabajo.

En condiciones óptimas se obtuvieron LDs entre 0,3 y 1,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  y precisiones (RSDs) entre 1,2 y 6,8 %. El dispositivo propuesto permitió una eficiente extracción de los contaminantes fenólicos (entre 88 y 100 %). El método mostró un buen desempeño en el análisis de muestras con matrices complejas (EDAR de Calvià, Mallorca, España), demostrando su potencial aplicación para el muestreo *in situ* o para ser utilizado en el laboratorio como una alternativa a la SPE convencional en jeringas, así como de escalarlo para su aplicación al tratamiento del agua.

La plataforma propuesta permite la integración del muestreo y la extracción de los analitos en un solo paso, acortando el tiempo de trabajo del analista, preservando la integridad de la muestra y obteniendo resultados representativos. El agitador es económico, fácil de construir y de usar. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en el que se hace uso para SPE de un agitador impreso en 3D con las paletas recubiertas con un adsorbente.

### 8.3. Artículo original

A continuación, se adjunta el artículo original: “A sampling platform incorporating 3D-printed paddles-stirrers coated with metal-organic framework MIL-100(Fe) for in-situ extraction of phenolic pollutants in biodigester supernatant and wastewater effluent samples” de M.A. Vargas-Muñoz, Carlos Palomino Cabello, Gemma Turnes Palomino y Edwin Palacio, así como su material suplementario, publicado en *Journal of Environmental Chemical Engineering* 11(5) (2023) 110503.

Enlace electrónico: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110503>





---

# **CAPÍTULO 9**

## **Conclusiones finales**

---

## Conclusiones

En la presente tesis doctoral se han desarrollado nuevos métodos analíticos para la monitorización de sustancias inhibitorias de los procesos de tratamiento biológico de agua residual.

- Con respecto a los trabajos que usan sistemas automatizados presentados en los capítulos 4 y 5:

Los métodos basados en técnicas de microextracción en flujo han conseguido la automatización del tratamiento de muestra, simplificando la etapa más larga e importante de un método analítico. Además, la miniaturización de estos sistemas ha permitido reducir el consumo de muestra y de reactivos, lo que ha disminuido el costo por análisis y la generación de residuos, resultando en métodos más respetuosos con el ambiente.

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) en jeringa llevada a cabo en un sistema cerrado ha demostrado ser una herramienta útil en la manipulación de analitos y disolventes orgánicos volátiles. De esta forma, se ha logrado minimizar la pérdida y la contaminación de la muestra, así como aumentar la seguridad laboral y mejorar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

La inclusión de un sistema de agitación magnética asistida (MSA) en la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) ha mejorado la eficiencia de la mezcla, lo que ha acelerado el procedimiento analítico y ha permitido aumentar la frecuencia de análisis. En concreto, el método desarrollado para los AGV permite tratar hasta 8 muestras por hora, mientras que el método para AGCL permite tratar hasta 6 muestras por hora.

Se han desarrollado métodos de análisis altamente precisos y selectivos para la determinación de AGV y AGCL en muestras de agua residual y de biodigestores. Para la elección de los disolventes se han considerado las propiedades de los analitos, y tras la optimización, se han obtenido condiciones específicas de extracción para cada grupo de ácidos orgánicos.

Estas metodologías analíticas presentan ventajas en comparación con otras existentes. Por un lado, la determinación de AGCL sin derivatización ha posibilitado un análisis cromatográfico rápido y simple. Por otro lado, en el caso de la extracción de AGV, al no requerir un dispersante, se ha evitado el consumo de un disolvente adicional y se ha reducido el tiempo de análisis.

En ambos casos, la extracción ha reducido las interferencias por la matriz de las muestras y ha evitado los problemas derivados de la inyección acuosa directa en el cromatógrafo de gases.

Adicionalmente, la preconcentración ha permitido alcanzar la sensibilidad necesaria para detectar las concentraciones típicas de estos compuestos en las muestras analizadas.

- Con respecto a los trabajos que emplean sistemas portables, presentados en los capítulos 6, 7 y 8:

Se han fabricado sensores de papel específicos para la determinación de amoníaco y sulfuro en muestras con matrices complejas. La metodología empleada, basada en la pervaporación y difusión gaseosa, ha evitado el tratamiento previo de la muestra y el taponamiento de las membranas hidrofóbicas y, al mismo tiempo, ha reducido posibles interferencias por la matriz de las muestras. Los discos de papel sensor integrados en la microplaca han proporcionado un análisis preciso y, por tanto, facilitado el análisis multiparamétrico y multimuestra. Además, se ha simplificado el proceso de preparación del sistema sensor, dado que no se requiere dibujar, imprimir o laminar la zona de detección. En general, la metodología propuesta reduce la generación de residuos líquidos y sólidos, debido a que la microplaca funciona como una plataforma reusable y se requieren bajos volúmenes de reactivos y muestra.

Para la determinación *in-situ* de los analitos se ha puesto a punto un sistema utilizando un teléfono móvil y una caja de luz alimentada por una batería portátil. La caja de luz, que se ha fabricado mediante impresión 3D, ha proporcionado condiciones fotográficas homogéneas. El sistema colorimétrico impreso en 3D es compacto, económico y puede ser utilizado en áreas con poca infraestructura o donde el suministro de energía es un problema. Así mismo, la facilidad de uso del sistema permite que no sea necesario contar con un analista especializado para llevar a cabo el experimento o realizar el mantenimiento del equipo. Cabe añadir que se ha desarrollado una macro programada en ImageJ que permite un análisis colorimétrico rápido y automático de un gran número de imágenes digitales, aprovechando las capacidades de procesamiento de una computadora.

Se ha desarrollado también un método para el análisis de hierro en campo. Se ha propuesto un sistema colorimétrico miniaturizado con espectrofotómetros CCD y soportes impresos en 3D para la fuente de luz y la cubeta. El resultado es un sistema compacto y portátil, donde todos los elementos se alimentan directamente a través de las conexiones USB de un ordenador portátil, que también se utiliza para la adquisición y tratamiento de los datos. Además, se ha añadido un pequeño circuito electrónico que regula con precisión la intensidad de luz de los LEDs. En conjunto, se ha llevado a cabo un procedimiento simple para la extracción en fase sólida de hierro. La preconcentración de hierro ha permitido la determinación sensible de hierro y brinda la

posibilidad de realizar la monitorización *in-situ* de este analito sin requerir instrumentación costosa.

Finalmente, se ha fabricado una plataforma de muestreo para la extracción *in-situ* de compuestos fenólicos, usando un agitador de paletas impreso en 3D unido a un motor alimentado por una batería portátil. La plataforma propuesta es económica, fácil de fabricar y de operar. Las paletas agitadoras que han sido recubiertas con una red metal-orgánica, el MIL-100(Fe), han permitido la extracción y preconcentración de los contaminantes fenólicos, gracias a las interacciones hidrofóbicas y  $\pi$ - $\pi$  entre el MOF y los fenoles. También, se ha demostrado una mejora en la capacidad de extracción cuando se ha empleado un agitador de flujo radial a altas velocidades.

En este método, las paletas del agitador son removibles y se pueden llevar al laboratorio para el análisis por HPLC-DAD. Esto evita la necesidad de transportar la muestra y aumenta la representatividad de los resultados. Como resultado, se simplifica y acorta la duración del proceso analítico, dado que la plataforma realiza simultáneamente el muestreo y la extracción de los analitos en un solo paso. Al final, el método analítico que emplea la plataforma propuesta ha mostrado un buen desempeño en el análisis de muestras complejas, lo que sugiere su potencial aplicación para la extracción de contaminantes en campo.

- Conclusiones generales:

En resumen, se han desarrollado nuevos métodos analíticos para la determinación de sustancias inhibitorias de los procesos de tratamiento biológico de agua residual. Por un lado, los métodos automatizados para el tratamiento de la muestra han proporcionado una mayor reproducibilidad, una reducción del consumo de muestra y reactivos, así como una disminución del tiempo y los costos de análisis. Por otro lado, los métodos en campo han dado lugar a procesos analíticos más simples, rentables y sostenibles. En general, todos los métodos propuestos en esta tesis doctoral fomentan los principios de la química analítica verde y la miniaturización.

En conclusión, las metodologías presentadas en este estudio han demostrado ser altamente aplicables a la monitorización de sustancias tóxicas para el tratamiento biológico de agua residual. Los resultados obtenidos evidencian la efectividad de estas metodologías y su potencial para convertirse en herramientas útiles en el análisis de rutina de las EDARs. En este sentido, se espera que las estrategias analíticas propuestas contribuyan a comprender mejor el comportamiento de estos contaminantes en los procesos de depuración, y, por ende, a proponer medidas de control eficientes para el tratamiento del agua residual.

## Conclusions

In this doctoral thesis, new analytical methods have been developed for the monitoring of inhibitory substances in biological wastewater treatment processes.

- Regarding the first two jobs using automated systems, presented in chapters 4 and 5:

Methods based on flow microextraction techniques have achieved the automation of sample treatment, simplifying the longest and most important stage of an analytical method. Also, the miniaturization of these systems has made it possible to reduce sample and reagent consumption, which has decreased the cost per analysis and the generation of waste, resulting in more environmentally friendly methods.

Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) in a syringe carried out in a closed system has proven to be a useful tool in the manipulation of analytes and volatile organic solvents. In this way, it has been possible to minimize the loss and contamination of the sample, increase the occupational safety and improve the reproducibility of the results obtained.

The inclusion of a magnetic assisted stirring (MSA) system in the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) has improved the mixing efficiency, which has accelerated the analytical procedure and allowed to increase the analysis frequency. Specifically, the method developed for VFA allowed to treat up to 8 samples per hour, while the method for LCFA allowed to treat up to 6 samples per hour.

Highly precise and selective analytical methods have been developed for the determination of VFA and LCFA in wastewater and biodigester samples. For the choice of solvents, the properties of the analytes have been considered, and after optimization, specific extraction conditions have been obtained for each group of organic acids.

These analytical methodologies have advantages compared to other existing ones. On the one hand, the determination of LCFA without derivatization has enabled a fast and simple chromatographic analysis. On the other hand, in the case of VFA extraction, by not requiring a dispersant, the consumption of an additional solvent has been avoided and the analysis time has been reduced.

In both cases, the extraction has reduced interferences by the matrix of the samples and has avoided the problems derived from direct aqueous injection into the gas chromatograph. Additionally, the preconcentration has made it possible to achieve the sensitivity necessary to detect the typical concentrations of these compounds in the samples analyzed.

- Regarding the works that use portable systems, presented in chapters 6, 7 and 8:

Specific paper sensors have been manufactured for the determination of ammonia and sulfide in samples with complex matrices. The methodology used, based on pervaporation and gaseous diffusion, has avoided the sample pretreatment and the clogging of the hydrophobic membranes and, at the same time, has reduced possible interferences by the sample matrix. The sensor paper discs embedded in the microplate have provided a precise analysis and thus, facilitated the multi-parameter and multi-sample analysis. In addition, the sensor system preparation process has been simplified, since the detection zone does not need to be drawn, printed or laminated. In general, the proposed methodology reduces the generation of liquid and solid waste, since the microplate works as a reusable platform and low volumes of reagents and sample are required.

For the *in-situ* determination system of the analytes, a system using a mobile phone and a light box powered by a portable battery has been developed. The light box, which has been manufactured by 3D-printing, has provided homogeneous photographic conditions. The 3D-printed colorimetric system is compact, inexpensive and can be used in areas with little infrastructure or where power supply is a problem. Likewise, the ease of use of the system means that it is not necessary to have a specialized analyst to carry out the experiment or perform the maintenance of the equipment. It should be added that a macro programmed in ImageJ has been developed, which allows rapid and automatic colorimetric analysis of a large number of digital images, taking advantage of the processing capabilities of a computer.

A method has also been developed for the analysis of iron in the field. A miniaturized colorimetric system with CCD spectrophotometers and 3D-printed supports for the light source and cuvette has been proposed. The result is a compact and portable system, where all the elements are powered directly through the USB connections of a laptop, which is also used for data acquisition and processing. In addition, a small electronic circuit that precisely regulates the light intensity of the LEDs has been added. Altogether, a simple procedure for the solid phase extraction of iron has been carried out. Iron preconcentration has enabled the sensitive determination of iron and offers the possibility of *in-situ* monitoring of this analyte without requiring expensive instrumentation.

Finally, a sampling platform for the *in-situ* extraction of phenolic compounds has been fabricated, using a 3D-printed paddle stirrer connected to a motor powered by a portable battery. The proposed platform is cheap, easy to manufacture and to operate. The stirrer paddles that have been coated with a metal-organic network, MIL-100(Fe), have allowed the favorable extraction and preconcentration of the phenolic contaminants, thanks to the hydrophobic and  $\pi$ - $\pi$  interactions

between the MOF and the phenols. Also, an improvement in extraction capacity has been demonstrated when a radial flow stirrer has been used at high speeds.

In this method, the stirrer paddles are removable and can be taken to the laboratory for analysis by HPLC-DAD. This avoids the need to transport the sample and increases the representativeness of the results. As a result, the analytical process is simplified and shortened, since the platform simultaneously performs sampling and extraction of analytes in a single step. In the end, the analytical method used by the proposed platform has shown good performance in the analysis of complex samples, which suggests the potential application of the device for the extraction of contaminants in the field.

- General conclusions:

In summary, new analytical methods have been developed for the determination of inhibitory substances in biological wastewater treatment processes. On the one hand, automated methods for sample treatment have provided greater reproducibility, a reduction in sample and reagent consumption, as well as a decrease in analysis time and costs. On the other hand, field methods have led to simpler, more profitable and sustainable analytical processes. In general, all the methods proposed in this doctoral thesis promote the principles of green analytical chemistry and miniaturization.

In conclusion, the methodologies presented in this study have proven to be highly applicable to the monitoring of toxic substances for the biological treatment of wastewater. The results obtained show the effectiveness of these methodologies and their potential to become useful tools in the routine analysis of WWTPs. In this sense, it is expected that the proposed analytical strategies contribute to a better understanding of the behavior of these contaminants in purification processes, and, therefore, to propose efficient control measures for wastewater treatment.





## Referencias

- [1] V.A. Tzanakakis, N. v. Paranychianakis, A.N. Angelakis, Water supply and water scarcity, *Water* (Switzerland). 12 (2020) 2347. <https://doi.org/10.3390/w12092347>.
- [2] G. Mannina, H. Gulhan, B.J. Ni, Water reuse from wastewater treatment: The transition towards circular economy in the water sector, *Bioresour. Technol.* 363 (2022) 127951. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127951>.
- [3] Ministerio de la presidencia, Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, *Boletín Oficial del Estado*, 8 de diciembre, España, 2008. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2007/12/07/1620/dof/spa/pdf>.
- [4] V. Hernández-Chover, L. Castellet-Viciano, R. Fuentes, F. Hernández-Sancho, Circular economy and efficiency to ensure the sustainability in the wastewater treatment plants, *J Clean Prod.* 384 (2023) 135563. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135563>.
- [5] M.L. Partyka, R.F. Bond, Wastewater reuse for irrigation of produce: A review of research, regulations, and risks, *Science of the Total Environment* 828 (2022) 154385. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154385>.
- [6] J.L. Chen, R. Ortiz, T.W.J. Steele, D.C. Stuckey, Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 1523–1534. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.005>.
- [7] Y. Chen, J.J. Cheng, K.S. Creamer, Inhibition of anaerobic digestion process: A review, *Bioresour Technol.* 99 (2008) 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>.
- [8] R. Sathya, M.V. Arasu, N.A. Al-Dhabi, P. Vijayaraghavan, S. Ilavenil, T.S. Rejiniemon, Towards sustainable wastewater treatment by biological methods – A challenges and advantages of recent technologies, *Urban. Clim.* 47 (2023) 101378. <https://doi.org/10.1016/j.uclim.2022.101378>.
- [9] Y. Xiao, C. de Araujo, C.C. Sze, D.C. Stuckey, Toxicity measurement in biological wastewater treatment processes: A review, *J. Hazard. Mater.* 286 (2015) 15–29. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.033>.
- [10] American Public Health Association - APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th Ed, Washington DC, 1998.
- [11] M.F.T. Sá, V. Castro, A.I. Gomes, D.F.S. Morais, R.V.P.S. Silva Braga, I. Saraiva, B.M. Souza-Chaves, M. Park, V. Fernández-Fernández, R. Rodil, R. Montes, J.B. Quintana, V.J.P. Vilar, Tracking pollutants in a municipal sewage network impairing the operation of a wastewater treatment plant, *Science of the Total Environment* 817 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152518>.
- [12] J. Pawliszyn, Why move analysis from laboratory to on-site?, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006) 633–634. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.06.002>.

- [13] M. Petrović, S. Gonzalez, D. Barceló, Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 685–696. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01105-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01105-1).
- [14] S.I. Kaya, A. Cetinkaya, S.A. Ozkan, Green analytical chemistry approaches on environmental analysis, *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 33 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00157>.
- [15] A.J. Englande, P. Krenkel, J. Shamas, Wastewater treatment & water reclamation, in: *Reference module in earth systems and environmental sciences*, Elsevier, 2015: pp. 639–670. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.09508-7>.
- [16] G. Strazzera, F. Battista, N.H. Garcia, N. Frison, D. Bolzonella, Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review, *J. Environ. Manage.* 226 (2018) 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039>.
- [17] R. Kumar, G.K. Saini, M. Jawed, Impact of emerging contaminants on biological wastewater treatment process, in: *Relationship Between Microbes and the Environment for Sustainable Ecosystem Services*, Volume 2, Elsevier, 2022: pp. 17–40. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-89937-6.00014-0>.
- [18] I.H. Franke-Whittle, A. Walter, C. Ebner, H. Insam, Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities, *Waste Management* 34 (2014) 2080–2089. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.020>.
- [19] A. Gogoi, P. Mazumder, V.K. Tyagi, G.G. Tushara Chaminda, A.K. An, M. Kumar, Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review, *Groundw. Sustain. Dev.* 6 (2018) 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>.
- [20] A. Agrawal, R. Keçili, F. Ghorbani-Bidkorbeh, C.M. Hussain, Green miniaturized technologies in analytical and bioanalytical chemistry, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 143 (2021) 116383. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116383>.
- [21] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Green analytical chemistry, in: *Green Chemistry Research Trends*, 2009: pp. 63–96. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822234-8.00006-8>.
- [22] A.M. Bevanda, S. Talić, A. Ivanković, Flow Injection Analysis Toward Green Analytical Chemistry, in: *Green Analytical Chemistry. Green Chemistry and Sustainable Technology*, 2019: pp. 299–323. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9105-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9105-7_10).
- [23] F. Chemat, S. Garrigues, M. de la Guardia, Portability in analytical chemistry: a green and democratic way for sustainability, *Curr. Opin. Green. Sustain. Chem.* 19 (2019) 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.07.007>.
- [24] Zeki Berk, Chapter 11 - Extraction, in: *Food science and technology, Food Process Engineering and Technology (Third Edition)*, 2018: pp. 289–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812018-7.00011-7>.

- [25] Y. Yamini, M. Rezaadeh, S. Seidi, Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 112 (2019) 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.010>.
- [26] R.E. Kannouma, M.A. Hammad, A.H. Kamal, F.R. Mansour, Miniaturization of Liquid-Liquid extraction; the barriers and the enablers, *Microchemical Journal* 182 (2022) 107863. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107863>.
- [27] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>.
- [28] L. Kocúrová, I.S. Balogh, J. Šandrejová, V. Andruch, Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review, *Microchemical Journal* 102 (2012) 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.12.002>.
- [29] P.P. Zhang, Z.G. Shi, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, A new device for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of UV filters in environmental water samples, *Talanta* 83 (2011) 1711–1715. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.11.076>.
- [30] J. Šandrejová, N. Campillo, P. Viñas, V. Andruch, Classification and terminology in dispersive liquid-liquid microextraction, *Microchemical Journal* 127 (2016) 184–186. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.03.007>.
- [31] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I), *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 80 (2016) 641–654. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>.
- [32] Gilson, A typical SPE workflow (s.f.). <https://es.gilson.com/>.
- [33] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 80 (2016) 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>.
- [34] A.A. Kotova, D. Thiebaut, J. Vial, A. Tissot, C. Serre, Metal-organic frameworks as stationary phases for chromatography and solid phase extraction: A review, *Coord. Chem. Rev.* 455 (2022) 214364. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214364>.
- [35] H.C.J. Zhou, S. Kitagawa, Metal-Organic Frameworks (MOFs), *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 5415–5418. <https://doi.org/10.1039/c4cs90059f>.
- [36] M. Safaei, M.M. Foroughi, N. Ebrahimpoor, S. Jahani, A. Omidi, M. Khatami, A review on metal-organic frameworks: Synthesis and applications, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 118 (2019) 401–425. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.007>.
- [37] P. Horcajada, S. Surblé, C. Serre, D.Y. Hong, Y.K. Seo, J.S. Chang, J.M. Grenèche, I. Margiolaki, G. Férey, Synthesis and catalytic properties of MIL-100(Fe), an iron (III) carboxylate with large pores, *Chemical Communications* (2007) 2820–2822. <https://doi.org/10.1039/b704325b>.

- [38] V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerdà, Evolution and description of the principal flow techniques, in: *Flow Analysis*, Elsevier, 2014: pp. 1–42. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59596-6.00001-2>.
- [39] V. Cerdà, A. Cerdà, *An introduction to flow analysis*, SCIWARE, S.L., Palma de Mallorca, España, 2009.
- [40] J. Ruzicka, G.D. Marshall, Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 9–343.
- [41] V. Cerdà, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, Flow techniques in water analysis, *Talanta* 50 (1999) 695–705. [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta).
- [42] A.N. Anthemidis, K.I.G. Ioannou, On-line sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples, *Talanta* 79 (2009) 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.03.005>.
- [43] M. Alexovič, B. Horstkotte, I. Šrámková, P. Solich, J. Sabo, Automation of dispersive liquid-liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 86 (2017) 39–55. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.10.003>.
- [44] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Completely automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction using solvents lighter than water, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1383–1388. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5572-4>.
- [45] B. Horstkotte, R. Suárez, P. Solich, V. Cerdà, In-syringe-stirring: A novel approach for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction, *Anal. Chim. Acta* 788 (2013) 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.049>.
- [46] V.A. Lemos, J.A. Barreto, L.B. Santos, R. dos S. de Assis, C.G. Novaes, R.J. Cassella, In-syringe dispersive liquid-liquid microextraction, *Talanta* 238 (2022) 123002. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123002>.
- [47] A. Jadhav, V.S. Jadhav, A review on 3D printing: An additive manufacturing technology, *Mater. Today. Proc.* 62 (2022) 2094–2099. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.02.558>.
- [48] H. Agrawaal, J.E. Thompson, Additive manufacturing (3D printing) for analytical chemistry, *Talanta Open* 3 (2021) 100036. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100036>.
- [49] L. Wang, M. Pumera, Recent advances of 3D printing in analytical chemistry: Focus on microfluidic, separation, and extraction devices, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 135 (2021) 116151. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116151>.
- [50] C.W. Hull, C.W. Lewis, Methods and apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography, US Patent 4999143, 1991.
- [51] 3D Network, *La guía de impresión de estereolitografía (SLA) en 3D* (2018). <https://3dnewworld.com/la-guia-de-impresion-de-estereolitografia-sla-en-3d/>.

- [52] FormLabs, Guía definitiva sobre impresión 3D por estereolitografía (SLA) (2023). <https://formlabs.com/es/blog/guia-definitiva-estereolitografia-sla-impresion-3d/>.
- [53] Craftcloud, ¿Qué es la impresión 3D FDM? (2023). <https://all3dp.com/2/fused-deposition-modeling-fdm-3d-printing-simply-explained/>
- [54] Hubs, What is FDM (fused deposition modeling) 3D printing? (2023). <https://3dprint.com/252271/3d-printing-metal-end-use-part-applications/>.
- [55] A.W. Martinez, S.T. Phillips, M.J. Butte, G.M. Whitesides, Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays, *Angewandte Chemie - International Edition* 46 (2007) 1318–1320. <https://doi.org/10.1002/anie.200603817>.
- [56] D.D. Liana, B. Raguse, J. Justin Gooding, E. Chow, Recent advances in paper-based sensors, *Sensors* 12 (2012) 11505–11526. <https://doi.org/10.3390/s120911505>.
- [57] M.I.G.S. Almeida, B.M. Jayawardane, S.D. Kolev, I.D. McKelvie, Developments of microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs) for water analysis: A review, *Talanta* 177 (2018) 176–190. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.072>.
- [58] Z. Yao, P. Coatsworth, X. Shi, J. Zhi, L. Hu, R. Yan, F. Güder, H.-D. Yu, Paper-based sensors for diagnostics, human activity monitoring, food safety and environmental detection, *Sensors & Diagnostics* 1 (2022) 312–342. <https://doi.org/10.1039/d2sd00017b>.
- [59] A.T. Singh, D. Lantigua, A. Meka, S. Taing, M. Pandher, G. Camci-Unal, Paper-based sensors: Emerging themes and applications, *Sensors* 18 (2018) 2838. <https://doi.org/10.3390/s18092838>.
- [60] Y. Fan, J. Li, Y. Guo, L. Xie, G. Zhang, Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review, *Measurement* 171 (2021) 108829. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829>.
- [61] O. Elsholz, B. Horstkotte, V. Cerdá, Review on automation using multisyringe flow injection analysis, *J. Flow Injection Anal.* 22 (2005) 99–109. <https://www.researchgate.net/publication/228373926>.
- [62] Takasago Fluidic Systems, Solenoid valve (s.f.). <https://www.takasago-fluidics.com>.
- [63] Knauer, Injection valve (s.f.). <https://www.knauer.net/en/Blog/Sample-injection>.
- [64] Pavan M. V. Raja, Andrew R. Barron, UV-Visible Spectroscopy, *Physical Methods in Chemistry and Nano Science*. (2022). <https://chem.libretexts.org/@go/page/55881>.
- [65] Alexander Scheeline, Thomas M. Spudich, Array Detectors, *Analytical Sciences Digital Library*. (2019). <https://chem.libretexts.org/@go/page/75538>.
- [66] Ocean Optics, USB4000 Fiber Optic Spectrometer, 2008. [www.oceanoptics.com](http://www.oceanoptics.com).
- [67] Ocean Optics, STS spectrometer (s.f.). <https://old.spectrecology.com/sts-spectrometer/>.
- [68] Informer Technologies, SpectraSuite 2.0, (2023). <https://spectrasuite.software.informer.com/2.0/>.

- [69] Crawford Scientific, Theory of HPLC (s.f.). [www.chromacademy.com](http://www.chromacademy.com).
- [70] John W. Dolan, How Does It Work? Part IV: Ultraviolet Detectors (2016) 534–539. <https://www.chromatographyonline.com>.
- [71] Shimadzu, UV vs Diode-Array (PDA) Detectors for (U)HPLC, (s.f.). <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/liquid-chromatography/>.
- [72] Agilent Technologies, Gas Chromatography Fundamentals, (s.f.). <https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography>.
- [73] C.F. Poole, Ionization-based detectors for gas chromatography, *J. Chromatogr A* 1421 (2015) 137–153. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.061>.
- [74] F.A. Mellon, Mass spectrometry, principles and instrumentation, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. (2003) 3739–3749.
- [75] Natalie Z.M. Home, Clinical mass spectrometry: a short review, *Spectroscopy Europe* 23 (2011) 14–16. [https://www.spectroscopyeurope.com/system/files/pdf/MS\\_23\\_3.pdf](https://www.spectroscopyeurope.com/system/files/pdf/MS_23_3.pdf).
- [76] Bragg W. H., The structure of magnetite and spinels, *Nature* 95 (1915) 561.
- [77] R.W. James, *The Optical Principles of the Diffraction of X-rays*, G. Bell and Sons, London, 1962.
- [78] Franklin and Marshall College, X-ray diffraction (XRD) basics and application (2022). <https://chem.libretexts.org/@go/page/148442>.
- [79] Mehmet Gumustas, Ceyda T. Sengel-Turk, Aysen Gumustas, Sibel A. Ozkan, Bengi Uslu, Chapter 5 - Effect of polymer-based nanoparticles on the assay of antimicrobial drug delivery systems, in: *Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics*, 2017: pp. 67–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8>.
- [80] G.M. Gladysz, K.K. Chawla, Void characterization techniques, in: *Voids in Materials*, Elsevier, 2021: pp. 167–187. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819282-5.00008-9>.
- [81] Laboratorio de técnicas espectroscópicas (LABTE) de la Universidad Rey Juan Carlos, Adsorción física de gases, (s.f.). <http://www.labte.es/index.php/es/2013-11-03-19-54-23/propiedades-texturales/adsorcion-fisica-de-gases>.
- [82] B.J. Ford, S. Bradbury, D.C. Joy, Scanning electron microscope, *Encyclopedia Britannica*. (2023). <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope>.
- [83] Robert McNeel & Associates (Rhinceros), Características de Rhinceros (2023). <https://www.rhino3d.com/features/>.
- [84] Formlabs, Form 3+ (2023). <https://formlabs.com/3d-printers/form-3/>.
- [85] Ultimaker, Ultimaker S5 (2023). <https://ultimaker.com/3d-printers/ultimaker-s5>.
- [86] Formlabs, Safety data sheet, Clear resin, 2016. [https://formlabs-media.formlabs.com/datasheets/Safety\\_Data\\_Sheet\\_EN\\_-\\_Clear.pdf](https://formlabs-media.formlabs.com/datasheets/Safety_Data_Sheet_EN_-_Clear.pdf).

- [87] Formlabs, Safety data sheet, Black resin, 2022. <https://formlabs-media.formlabs.com/datasheets/1801033-SDS-ENEU-0.pdf>.
- [88] Regulation of the European Parliament and Council Regulation (EC) No 1907/2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), Safety data sheet, PLA extrafill, 2014. [https://filament2print.com/es/index.php?controller=attachment&id\\_attachment=212](https://filament2print.com/es/index.php?controller=attachment&id_attachment=212).
- [89] ThermoFisher Scientific, Ficha de datos de seguridad de isopropanol, 2020. <https://www.fishersci.es/store/msds?partNumber=10657411&productDescription=500ML+Isopropanol%2C+99.6%25%2C+ACS+reagent&countryCode=ES&language=es>.
- [90] Formlabs, Consejos de seguridad, Form 3, 2022. <https://media.formlabs.com/m/47089ecb4f42532b/original/-ES-Form-3-Safety-Booklet.pdf>.
- [91] Ultimaker, Ultimaker S5 material station, installation and user manual, 2020. [https://asset.dynamism.com/media/catalog/product/pdf/Ultimaker\\_S5\\_Material\\_Station\\_User\\_Manual\\_v2.0.pdf](https://asset.dynamism.com/media/catalog/product/pdf/Ultimaker_S5_Material_Station_User_Manual_v2.0.pdf).
- [92] Ultra-Violet Products (UVP), Ultraviolet Crosslinkers, operating instructions and service manual, 2021. <https://acmerevival.com/wp-content/uploads/2021/06/UVP-CL-1000-UV-CrosslinkerUserManual.pdf>.
- [93] ImageJ, Download (2023). <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.
- [94] S. Ferreira, Introdução as técnicas de planeamento de experimentos, 1ª, Salvador, 2015.
- [95] S.L.C. Ferreira, Chemometrics and statistics, experimental design, 3rd ed., Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14536-6>.
- [96] F. Raposo, R. Borja, J.A. Cacho, J. Mumme, K. Orupöld, S. Esteves, J. Noguerol-Arias, S. Picard, A. Nielfa, P. Scherer, I. Wierinck, E. Aymerich, C. Cavinato, D.C. Rodriguez, N. García-Mancha, P.N.T. Lens, V. Fernández-Cegrí, First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: Evaluating sources of error, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 51 (2013) 127–143. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.07.007>.
- [97] F. Raposo, R. Borja, J.A. Cacho, J. Mumme, ngel F. Mohedano, A. Battimelli, D. Bolzonella, A.D. Schuit, J. Noguerol-Arias, J.C. Frigon, G.A. Peñuela, J. Muehlenberg, C. Sambusiti, Harmonization of the quantitative determination of volatile fatty acids profile in aqueous matrix samples by direct injection using gas chromatography and high-performance liquid chromatography techniques: Multi-laboratory validation study, *J. Chromatogr. A* 1413 (2015) 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.008>.
- [98] A. Banel, B. Zygmunt, Application of gas chromatography-mass spectrometry preceded by solvent extraction to determine volatile fatty acids in wastewater of municipal, animal farm and landfill origin, *Water Science and Technology* 63 (2011) 590–597. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.204>.

- [99] N.T. Mkhize, T.A.M. Msagati, B.B. Mamba, M. Momba, Determination of volatile fatty acids in wastewater by solvent extraction and gas chromatography, *Physics and Chemistry of the Earth* 67–69 (2014) 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2013.10.008>.
- [100] S.P. Yo, Analysis of volatile fatty acids in wastewater collected from a pig farm, *Chemosphere* 38 (1999) 823–834.
- [101] M. Ghidotti, D. Fabbri, C. Torri, S. Piccinini, Determination of volatile fatty acids in digestate by solvent extraction with dimethyl carbonate and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 1034 (2018) 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.082>.
- [102] F. Raposo, R. Borja, J.A. Cacho, J. Mumme, K. Orupöld, S. Esteves, J. Noguerol-Arias, S. Picard, A. Nielfa, P. Scherer, I. Wierinck, E. Aymerich, C. Cavinato, D.C. Rodriguez, N. García-Mancha, P.N.T. Lens, V. Fernández-Cegri, First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: Evaluating sources of error, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 51 (2013) 127–143. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.07.007>.
- [103] R. Fernández, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, G.C. Premier, Critical analysis of methods for the measurement of volatile fatty acids, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 46 (2016) 209–234. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1073493>.
- [104] H.A.C. Montgomery, J.F. Dymock, N.S. Thom, The rapid colorimetric determination of organic acids and their salts in sewage-sludge liquor, *Analyst* 87 (1962) 949–955.
- [105] E.M. Siedlecka, J. Kumirska, T. Ossowski, P. Glamowski, M. Gołebowski, J. Gajdus, Z. Kaczyński, P. Stepnowski, Determination of volatile fatty acids in environmental aqueous samples, *Pol. J. Environ. Stud.* 17 (2008) 351–356. [https://www.researchgate.net/publication/279889360\\_Determination\\_of\\_volatile\\_fatty\\_acids\\_in\\_environmental\\_aqueous\\_samples](https://www.researchgate.net/publication/279889360_Determination_of_volatile_fatty_acids_in_environmental_aqueous_samples).
- [106] E. Palacio-Barco, F. Robert-Peillard, J.L. Boudenne, B. Coulomb, On-line analysis of volatile fatty acids in anaerobic treatment processes, *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.019>.
- [107] F. Robert-Peillard, J.L. Boudenne, B. Coulomb, Individual volatile fatty acids determination by chromogenic derivatization coupled to multi-syringe chromatography, *Talanta* 115 (2013) 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.019>.
- [108] V. Diamantis, P. Melidis, A. Aivasidis, Continuous determination of volatile products in anaerobic fermenters by on-line capillary gas chromatography, *Anal. Chim. Acta* 573–574 (2006) 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.036>.
- [109] T. Pruksatrakul, P. Phoopraintra, P. Wilairat, P. Chaiyen, R. Chantiwas, Development of a sequential injection-liquid microextraction procedure with GC-FID for analysis of short-chain fatty acids in palm oil mill effluent, *Talanta* 165 (2017) 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.010>.



- [110] A.I. Khdair, G. Abu-Rumman, S.I. Khdair, Pollution estimation from olive mills wastewater in Jordan, *Heliyon* 5 (2019) e02386. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02386>.
- [111] I. Brondz, Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques, *Anal. Chim. Acta* 465 (2002) 1–37.
- [112] J.R. Kanicky, A.F. Poniatowski, N.R. Mehta, D.O. Shah, Cooperativity among molecules at interfaces in relation to various technological processes: Effect of chain length on the pKa of fatty acid salt solutions, *Langmuir* 16 (2000) 172–177. <https://doi.org/10.1021/la990719o>.
- [113] C.Y. Geng, M. Zhang, C.Y. Li, Y.H. Jin, C.G. Yan, Y. Jin, Effectiveness of medium-chain fatty acids on feed intake and weight gain in animal: Depending on balance, *Indian J. Anim. Res.* 50 (2016) 885–892. <https://doi.org/10.18805/ijar.v0iOF.4554>.
- [114] M. Anwar, M.G. Rasul, N. Ashwath, M.M. Rahman, Optimisation of second-generation biodiesel production from australian native stone fruit oil using response surface method, *Energies* 11 (2018) 2566. <https://doi.org/10.3390/en11102566>.
- [115] J.R. Kanicky, D.O. Shah, Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pKa of long-chain fatty acids, *J. Colloid Interface Sci.* 256 (2002) 201–207. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.8009>.
- [116] B. Chowdhury, L. Lin, B.R. Dhar, M.N. Islam, D. McCartney, A. Kumar, Enhanced biomethane recovery from fat, oil, and grease through co-digestion with food waste and addition of conductive materials, *Chemosphere* 236 (2019) 124362. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124362>.
- [117] M.M. Alves, M.A. Pereira, D.Z. Sousa, A.J. Cavaleiro, M. Picavet, H. Smidt, A.J.M. Stams, Waste lipids to energy: How to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA), *Microb. Biotechnol.* 2 (2009) 538–550. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00100.x>.
- [118] P.C. Chan, R.A. de Toledo, H. Shim, Anaerobic co-digestion of food waste and domestic wastewater – Effect of intermittent feeding on short and long chain fatty acids accumulation, *Renew. Energy.* 124 (2018) 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.029>.
- [119] J. Wu, H.K. Lee, Ion-pair dynamic liquid-phase microextraction combined with injection-port derivatization for the determination of long-chain fatty acids in water samples, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.006>.
- [120] L. Neves, M.A. Pereira, M. Mota, M.M. Alves, Detection and quantification of long chain fatty acids in liquid and solid samples and its relevance to understand anaerobic digestion of lipids, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.018>.
- [121] E. Pusvaskiene, B. Januskevicius, A. Prichodko, V. Vickackaite, Simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction for fatty acid GC determination in water, *Chromatographia* 69 (2009) 271–276. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0885-y>.

- [122] G.H. Siang, A. Makahleh, B. Saad, B.P. Lim, Hollow fiber liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detection for the profiling of fatty acids in vegetable oils, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8073–8078. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.052>.
- [123] H. Zhang, Z. Wang, O. Liu, Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids, *J. Pharm. Anal.* 5 (2015) 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.005>.
- [124] Z. Meng, D. Wen, D. Sun, F. Gao, W. Li, Y. Liao, H. Liu, Rapid determination of C12–C26 non-derivatized fatty acids in human serum by fast gas chromatography, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1537–1543. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600344>.
- [125] Y. Jiang, Y. Zhang, C.J. Banks, Determination of long chain fatty acids in anaerobic digesters using a rapid non-derivatisation GC-FID method, *Water Science and Technology* 66 (2012) 741–747. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.063>.
- [126] Agency for toxic substances and disease registry (ASTDR), Toxicological profile for n-hexane, Atlanta, US, 1999. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>.
- [127] L.O.C. Šraj, M.I.G.S. Almeida, S.E. Swearer, S.D. Kolev, I.D. McKelvie, Analytical challenges and advantages of using flow-based methodologies for ammonia determination in estuarine and marine waters, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 59 (2014) 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.012>.
- [128] E. Alinezhad, M. Haghghi, F. Rahmani, H. Keshizadeh, M. Abdi, K. Naddafi, Technical and economic investigation of chemical scrubber and bio-filtration in removal of H<sub>2</sub>S and NH<sub>3</sub> from wastewater treatment plant, *J. Environ. Manage.* 241 (2019) 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.003>.
- [129] K. Lin, Y. Zhu, Y. Zhang, H. Lin, Determination of ammonia nitrogen in natural waters: Recent advances and applications, *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 24 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00073>.
- [130] L. Wang, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, L. de Castro, S.D. Kolev, Pervaporation-flow injection determination of ammonia in the presence of surfactants, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 177–184.
- [131] V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerdà, Environmental Applications, in: *Flow Analysis*, Elsevier, 2014: pp. 175–245. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59596-6.00007-3>.
- [132] A. Cerdà, M.T. Oms, R. Forteza, V. Cerdà, Evaluation of flow injection methods for ammonium determination in wastewater samples, *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 165–173.
- [133] M.I.G.S. Almeida, J.M. Estela, M.A. Segundo, V. Cerdà, A membraneless gas-diffusion unit - Multisyringe flow injection spectrophotometric method for ammonium determination in untreated environmental samples, *Talanta* (2011) 1244–1252. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.12.052>.

- [134] L. Hong, X. Sun, L. Wang, Determination of ammonia in water using flow injection analysis with automatic pervaporation enrichment, *Anal. Lett.* 42 (2009) 2364–2377. <https://doi.org/10.1080/00032710903137442>.
- [135] B.M. Jayawardane, I.D. McKelvie, S.D. Kolev, Development of a gas-diffusion microfluidic paper-based analytical device ( $\mu$ PAD) for the determination of ammonia in wastewater samples, *Anal. Chem.* 87 (2015) 4621–4626. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00125>.
- [136] P. Phansi, S. Sumantakul, T. Wongpakdee, N. Fukana, N. Ratanawimarnwong, J. Sitanurak, D. Nacapricha, Membraneless gas-separation microfluidic paper-based analytical devices for direct quantitation of volatile and nonvolatile compounds, *Anal. Chem.* 88 (2016) 8749–8756. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02103>.
- [137] Y.B. Cho, S.H. Jeong, H. Chun, Y.S. Kim, Selective colorimetric detection of dissolved ammonia in water via modified Berthelot's reaction on porous paper, *Sens. Actuators B Chem.* 256 (2018) 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.069>.
- [138] P. Jaikang, P. Paengnakorn, K. Grudpan, Simple colorimetric ammonium assay employing well microplate with gas pervaporation and diffusion for natural indicator immobilized paper sensor via smartphone detection, *Microchemical Journal* 152 (2020) 104283. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104283>.
- [139] C. Rungsima, N. Boonyan, M. Klorvan, B. Kusuktham, Hydrogel sensors with pH sensitivity, *Polymer Bulletin* 78 (2021) 5769–5787. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03398-8>.
- [140] S.L. Malone Rubright, L.L. Pearce, J. Peterson, Environmental toxicology of hydrogen sulfide, *Nitric Oxide* 71 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.09.011>.
- [141] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological profile for hydrogen sulfide, US, 2006.
- [142] O.A. Habeeb, R. Kanthasamy, G.A.M. Ali, S. Sethupathi, R.B.M. Yunus, Hydrogen sulfide emission sources, regulations, and removal techniques: A review, *Reviews in Chemical Engineering* 34 (2018) 837–854. <https://doi.org/10.1515/revce-2017-0004>.
- [143] Comisión Europea, Directiva 2009/161/UE por la que se establece una tercera lista de valores límite de exposición profesional, 2009. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0161&from=ES>.
- [144] J. Pla-Tolós, Y. Moliner-Martínez, J. Verdú-Andrés, J. Casanova-Chafer, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, New optical paper sensor for in situ measurement of hydrogen sulphide in waters and atmospheres, *Talanta* 156–157 (2016) 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.013>.
- [145] N.S. Lawrence, J. Davis, R.G. Compton, Analytical strategies for the detection of sulfide: a review, *Talanta* 52 (2000) 771–784. [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta).

- [146] L. Ferrer, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, Analytical methodologies for reliable sulfide determinations in aqueous matrices exploiting flow-based approaches, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.014>.
- [147] G. de Armas, L. Ferrer, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, In-line membrane separation method for sulfide monitoring in wastewaters exploiting multisyringe flow injection analysis, *Anal. Chim. Acta* (2004) 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.050>.
- [148] L. Ferrer, J.M. Estela, V. Cerdà, A smart multisyringe flow injection system for analysis of sample batches with high variability in sulfide concentration, *Anal. Chim. Acta* 573–574 (2006) 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.02.031>.
- [149] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Improving the chemiluminescence-based determination of sulphide in complex environmental samples by using a new, automated multi-syringe flow injection analysis system coupled to a gas diffusion unit, *Anal. Chim. Acta* 601 (2007) 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.030>.
- [150] L. Engel, K.R. Tarantik, C. Pannek, J. Wöllenstein, Screen-printed sensors for colorimetric detection of hydrogen sulfide in ambient air, *Sensors* 19 (2019) 1182. <https://doi.org/10.3390/s19051182>.
- [151] A.P. Vargas, F. Gámez, J. Roales, T. Lopes-Costa, J.M. Pedrosa, A paper-based ultrasensitive optical sensor for the selective detection of H<sub>2</sub>S vapors, *Chemosensors* 9 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9020040>.
- [152] G. Baek, J. Kim, C. Lee, A review of the effects of iron compounds on methanogenesis in anaerobic environments, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 113 (2019) 109282. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109282>.
- [153] El Confidencial, El mayor vertedero de Mallorca contamina un acuífero con once metales pesados (2021). [https://www.elconfidencial.com/medioambiente/ciudad/2021-07-07/vertedero-mallorca-contaminacion-metales-pesados\\_3169804/](https://www.elconfidencial.com/medioambiente/ciudad/2021-07-07/vertedero-mallorca-contaminacion-metales-pesados_3169804/).
- [154] Comisión Europea, Directiva 2020/2184/UE relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, 2020. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184&from=es>.
- [155] B.V. Mohite, Iron Determination-A Review of Analytical Methods, 4 (2011). [www.ajronline.org](http://www.ajronline.org).
- [156] M.A. Kassem, A.S. Amin, Spectrophotometric determination of iron in environmental and food samples using solid phase extraction, *Food Chem.* 141 (2013) 1941–1946. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.038>.
- [157] F. Cheng, T. Zhang, C. Yang, H. Zhu, Y. Li, T. Sun, C. Zhou, A direct and rapid method for determination of total iron in environmental samples and hydrometallurgy using UV–Vis spectrophotometry, *Microchemical Journal* 179 (2022) 107478. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107478>.

- [158] M. Soy lak, Solid phase extraction of Cu(II), Pb(II), Fe(III), Co(II), and Cr(III) on Chelex-100 column prior to their flame atomic absorption spectrometric determinations, *Anal. Lett.* 37 (2004) 1203–1217. <https://doi.org/10.1081/AL-120034064>.
- [159] C. Calderilla, F. Maya, V. Cerdà, L.O. Leal, 3D printed device including disk-based solid-phase extraction for the automated speciation of iron using the multisyringe flow injection analysis technique, *Talanta* 175 (2017) 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.028>.
- [160] E. Agustina, J. Goak, S. Lee, Y. Seo, J.Y. Park, N. Lee, Simple and precise quantification of iron catalyst content in carbon nanotubes using UV/Visible spectroscopy, *ChemistryOpen*. 4 (2015) 613–619. <https://doi.org/10.1002/open.201500096>.
- [161] W.W. Anku, M.A. Mamo, P.P. Govender, Phenolic compounds in water: Sources, reactivity, toxicity and treatment methods, in: *Phenolic compounds - natural sources, importance and applications*, InTech, 2017. <https://doi.org/10.5772/66927>.
- [162] K.A. Mohamad Said, A.F. Ismail, Z. Abdul Karim, M.S. Abdullah, A. Hafeez, A review of technologies for the phenolic compounds recovery and phenol removal from wastewater, *Process Safety and Environmental Protection* 151 (2021) 257–289. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.05.015>.
- [163] W. Wei, Q.S. Huang, J. Sun, J.Y. Wang, S.L. Wu, B.J. Ni, Polyvinyl chloride microplastics affect methane production from the anaerobic digestion of waste activated sludge through leaching toxic Bisphenol-A, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 2509–2517. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07069>.
- [164] N. Panigrahy, A. Priyadarshini, M.M. Sahoo, A.K. Verma, A. Daverey, N.K. Sahoo, A comprehensive review on eco-toxicity and biodegradation of phenolics: Recent progress and future outlook, *Environ. Technol. Innov.* 27 (2022) 102423. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102423>.
- [165] N. Salgueiro-González, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Trends in analytical methodologies for the determination of alkylphenols and bisphenol A in water samples, *Anal. Chim. Acta* 962 (2017) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.035>.
- [166] S. Mohammad Mirsoleimani Azizi, F.I. Hai, W. Lu, A. Al-Mamun, B. Ranjan Dhar, A review of mechanisms underlying the impacts of (nano)microplastics on anaerobic digestion, *Bioresour. Technol.* 329 (2021) 124894. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124894>.
- [167] Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for nitrophenols, US, 2022. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp50.pdf>.
- [168] National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bisphenol A, PubChem Compound Summary for CID 6623. (2004). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A>.

- [169] M. Czaplicka, Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment, *Science of the Total Environment* 322 (2004) 21–39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.09.015>.
- [170] C.M. Santana, Z.S. Ferrera, M.E.T. Padrón, J.J.S. Rodríguez, Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: New approaches, *Molecules* 14 (2009) 298–320. <https://doi.org/10.3390/molecules14010298>.
- [171] D. Kumar Yadav, J. Harjit, Determination of phenol compounds in waste water by using compelling agent: N-Phenyl-benzoic-hydroxamic acid, *IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)* 7 (2014) 6–12. [www.iosrjournals.org](http://www.iosrjournals.org).
- [172] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr A* 1138 (2007) 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.037>.
- [173] J.A. Padilla-Sánchez, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, N. Barco-Bonilla, J.L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich, Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 85 (2011) 2397–2404. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.081>.
- [174] G.M. Salcedo, L. Kupski, L. Degang, L.C. Marube, S.S. Caldas, E.G. Primel, Determination of fifteen phenols in wastewater from petroleum refinery samples using a dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography with a photodiode array detector, *Microchemical Journal* 146 (2019) 722–728. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.075>.
- [175] M. Saraji, M. Ghani, Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction followed by solid-phase microextraction and in situ derivatization for the determination of chlorophenols by gas chromatography-electron capture detection, *J. Chromatogr. A* 1418 (2015) 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.062>.
- [176] A. González, J. Avivar, V. Cerdà, Determination of priority phenolic pollutants exploiting an in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction-multisyringe chromatography system, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2013–2022. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8464-1>.
- [177] C. Zhong, M. He, H. Liao, B. Chen, C. Wang, B. Hu, Polydimethylsiloxane/covalent triazine frameworks coated stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of phenols in environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1441 (2016) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.073>.
- [178] Q. Liu, C. Yao, J. Liu, S. Wang, B. Shao, K. Yao, An efficient method to enrich, detect and remove bisphenol A based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MIL-100(Fe), *Microchemical Journal* 165 (2021) 106168. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106168>.

- [179] T. Boontongto, R. Burakham, Evaluation of metal-organic framework NH<sub>2</sub>-MIL-101(Fe) as an efficient sorbent for dispersive micro-solid phase extraction of phenolic pollutants in environmental water samples, *Heliyon* 5 (2019) e02848. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02848>.







**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**

**2023**

**ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA  
MONITORIZACIÓN DE SUSTANCIAS  
INHIBIDORAS DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS  
IMPLICADOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS  
RESIDUALES**

**María Alejandra Vargas Muñoz**



**Universitat**  
de les Illes Balears