



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**DISPOSITIVO IMPRESO EN 3D RECUBIERTO CON
RESINAS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA
LA DETERMINACIÓN DE FLUOROQUINOLONAS
MEDIANTE HPLC-FL**

Marc Mas Bosch

Grado de Química

Facultad de Ciencias

Año Académico 2022-23

DISPOSITIVO IMPRESO EN 3D RECUBIERTO CON RESINAS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE FLUOROQUINOLONAS MEDIANTE HPLC-FL

Marc Mas Bosch

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2022-23

Palabras clave del trabajo:

Impresión 3D, extracción en fase sólida, fluoroquinolonas, HPLC-FL

Laura Ferrer Trovato

Diego Barzallo

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resumen

Al inicio del siglo XXI se empezaron a determinar concentraciones significativas de antibióticos en el medioambiente, gracias al avance en los métodos de determinación y al aumento de la precisión de los instrumentos. Entre este grupo de antibióticos se encuentran las fluoroquinolonas (FQ), las cuales contribuyen a la contaminación y al aumento de la resistencia de las bacterias a los fármacos. Por este motivo se ha propuesto en este trabajo de fin de grado un método basado en un dispositivo 3D recubierto con resina de extracción en fase sólida para la extracción simultánea de 7 fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ácido oxolínico, ofloxacino, enrofloxacina, norfloxacino, difloxacino, danofloxacino) y su posterior separación y determinación mediante HPLC-FL.

El diseño del dispositivo consiste en prismas rectangulares apilados, permitiendo la formación de canales interiores que permiten la extracción efectiva debido a su alta superficie específica respecto a otros diseños. La técnica de impresión usada ha sido la estereolitografía (SLA), la cual utiliza resinas que se solidifican mediante radiación UV. Posteriormente, se ha impregnado el dispositivo mediante la técnica "stick and cure" con la resina de extracción en fase sólida C-18.

La extracción se llevó a cabo acoplado el dispositivo 3D impregnado a un rotor, manteniendo la agitación durante 30 min a 315 rpm. Posteriormente, se eluyeron los analitos retenidos en un sistema automatizado con 3 mL de metanol a $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, que se analizaron mediante HPLC-FL.

Con este método se obtuvieron las curvas de calibración para las 7 FQs estudiadas con resultados satisfactorios ($R^2 > 0.99$). Se han obtenido factores de enriquecimiento entre 7.7 y 8.9, y porcentajes de extracción entre 40.3 y 59.7 %. Los límites de detección se encuentran entre 0.1 y $1.3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ y los límites de cuantificación entre 0.3 y $4.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$.

Resum

A l'inici del segle XXI es van començar a determinar concentracions significatives d'antibiòtics al medi ambient, gràcies a l'avenç en els mètodes de determinació i a l'augment de la precisió dels instruments. Entre aquest grup d'antibiòtics hi ha les fluoroquinolones (FQ), les quals contribueixen a la contaminació i a l'augment de la resistència dels bacteris als fàrmacs. Per aquest motiu s'ha proposat en aquest treball de fi de grau un mètode basat en un dispositiu 3D recobert amb resina d'extracció en fase sòlida per a l'extracció simultània de 7 fluoroquinolones (ciprofloxacina, àcid oxolínic, ofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina, difloxacina) i la posterior separació i determinació mitjançant HPLC-FL.

El disseny del dispositiu consisteix en prismes rectangulars apilats, permetent la formació de canals interiors que permeten l'extracció efectiva degut a la seva alta superfície específica respecte a altres dissenys. La tècnica d'impressió utilitzada ha estat estereolitografia (SLA), la qual utilitza resines que se solidifiquen mitjançant radiació UV. Posteriorment, s'ha impregnat mitjançant la tècnica "stick and cure" amb una resina d'extracció en fase sòlida. Es van fer assajos per seleccionar la resina d'extracció i es va optimitzar el flux de l'eluent a l'etapa d'elució automatitzada.

La extracció es va fer acoblant el dispositiu imprès en 3D i impregnat amb resina C18 a un rotor i mantenint l'agitació durant 30 min a 315 rpm. Posteriorment es van eluir els analits retinguts en un sistema automatitzat amb 3 mL de metanol a $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, que es va analitzar mitjançant HPLC-FL.

Amb aquest mètode es van obtenir les corbes de calibratge per a les 7 FQs estudiades amb resultats satisfactoris ($R^2 > 0.99$). S'han obtingut factors d'enriquiment entre 7.7 i 8.9 i percentatges d'extracció entre 40.3 i 59.7 %. Els límits de detecció es troben entre 0.1 i 1.3 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ i els límits de quantificació entre 0.3 i 4.2 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$.

Abstract

At the beginning of the 21st century, significant concentrations of antibiotics in the environment began to be determined, thanks to advances in determination methods and increased precision of instruments. Among this group of antibiotics are the fluoroquinolones (FQs), which contribute to contamination and increase the resistance of bacteria to drugs. For this reason, a method based on a 3D device coated with solid phase extraction resin for the simultaneous extraction of 7 fluoroquinolones (ciprofloxacin, oxolinic acid, ofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, difloxacin, danofloxacin) has been proposed in this final degree project.) and its subsequent separation and determination by HPLC-FL.

The device design consists of stacked rectangular prisms, allowing the formation of interior channels that allow effective extraction due to its high specific surface area compared to other designs. The printing technique used has been stereolithography (SLA), which uses resins that are solidified by UV radiation. Subsequently, it has been impregnated using the "stick and cure" technique with a solid phase extraction resin. Assays were performed to select the extraction resin and the eluent flow was optimized in the automated elution step.

The extraction was carried out by coupling the 3D printed device impregnated with C18 resin to a rotor and maintaining agitation for 30 min at 315 rpm. Subsequently, the retained analytes were eluted in an automated system with 3 mL of methanol at $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, which was analyzed by HPLC-FL.

Applying this method, the calibration curves for the 7 FQs studied were obtained with satisfactory results ($R^2 > 0.99$). Enrichment factors between 7.7 and 8.9 and extraction percentages between 40.3 and 59.7 % have been obtained. The detection limits are between 0.1 and $1.3 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ and the quantification limits between 0.3 and $4.2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Índice

1. Introducción.....	7
1.1 Fluoroquinolonas	7
1.2 Extracción en fase sólida mediante dispositivos impresos en 3D.....	9
1.3 Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FL)....	10
2. Objetivos	11
3. Materiales y Métodos	11
3.1 Diseño e impresión del dispositivo 3D.....	12
3.2 Impregnación con resinas de extracción	13
3.3 Selección de la resina de extracción	14
3.4 Optimización del caudal de elución.....	15
3.5 Separación cromatográfica y factores de enriquecimiento y preconcentración	15
3.6 Curvas de calibrado y límites de detección y cuantificación	16
3.7 SEM.....	17
4. Resultados y discusión.....	17
4.1 Diseño dispositivo 3D	17
4.2 Selección de la resina de extracción en fase sólida	19
4.3 Evaluación de la impregnación	20
4.4 Elución.....	22
4.5 Cromatogramas y factores de enriquecimiento y preconcentración	22
4.6 Curvas de calibrado	24
4.7 Parámetros analíticos	28
5. Conclusiones.....	30
6. Bibliografía	30

1. Introducción

1.1 Fluoroquinolonas

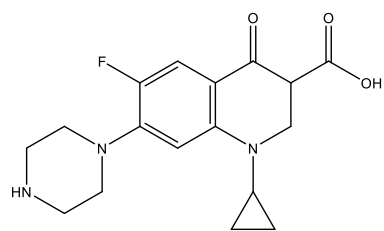
Los medicamentos son un elemento clave para la salud tanto humana como animal y han ayudado a aumentar nuestro nivel de vida actual. En su gran mayoría, los fármacos son un amplio grupo de moléculas orgánicas que se pueden clasificar en diversos tipos, como los antibióticos, antisépticos, antivirales, analgésicos, antipiréticos o antiinflamatorios, normalmente según su función y efectos. Entre los principales antibióticos, las fluoroquinolonas (FQ) tienen un peso importante, ya que son el tercer grupo más grande de medicamentos antibacterianos del mercado¹.

Las FQs son un tipo de quinolonas que presentan un átomo de flúor en su estructura. Se clasifican en cuatro generaciones, según su evolución y su papel antibacteriano. Su mecanismo de actuación es inhibir las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV, las cuales forman parte de la replicación del ADN.

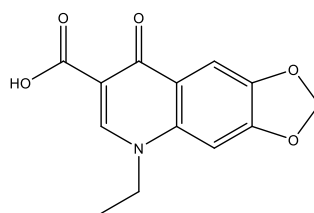
En los últimos años, diversos estudios han encontrado la presencia de FQs en diferentes muestras medioambientales, tales como aguas superficiales, subterráneas o incluso aguas para el consumo humano². Estos fármacos presentan un perfil ecotóxico, pero el principal efecto que provoca la presencia en el medio ambiente es que pueden ayudar a la resistencia de algunas bacterias a los antibióticos, una problemática sanitaria actual de gran importancia.

Las FQs no son metabolizadas completamente por el organismo. De hecho, dependiendo de la fluoroquinolona, se excreta entre un 22 - 87 % de su masa inalterada³. Por este motivo, y debido al aumento en el consumo de antibióticos, se ha observado su presencia en aguas residuales, en concentraciones máximas de 3 - 87 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ³. Sin embargo, se suelen encontrar en concentraciones más bajas, del orden de $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$. Actualmente no existe una tecnología en las EDARs que permita eliminar en su totalidad los antibióticos de las aguas, de modo que se abocan al medioambiente. Por estos motivos, se evidencia la necesidad de desarrollar métodos para determinar las FQs en diferentes matrices de aguas.

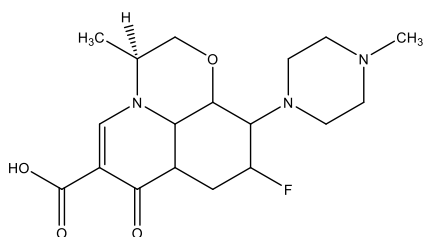
En este trabajo se analizarán siete FQs, ciprofloxacino (CIP), ácido oxolínico (OXO), ofloxacino (FLU), enrofloxacin (ENR), norfloxacino (NOR), difloxacino (DIF), y danofloxacino (DAN), cuyas estructuras se muestran en la Figura 1.



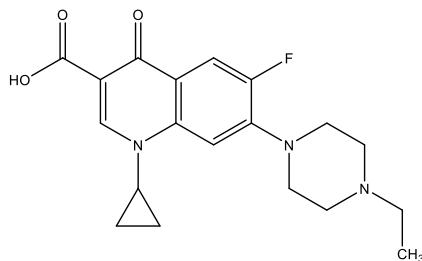
Ciprofloxacin



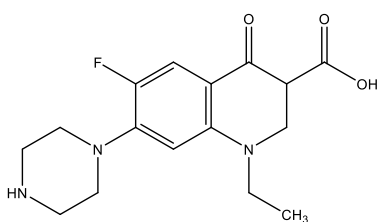
Ácido oxolinico



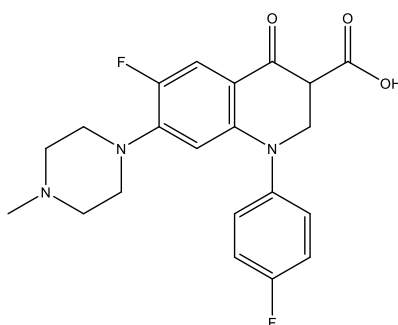
Ofloxacin



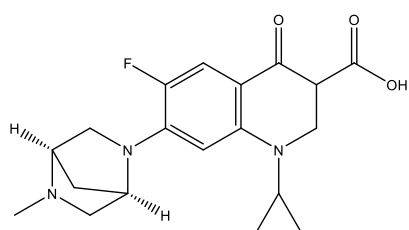
Enrofloxacin



Norfloxacin



Difloxacin



Danofloxacin

Figura 1. Estructura de las siete fluoroquinolonas estudiadas.

1.2 Extracción en fase sólida mediante dispositivos impresos en 3D

Para determinar las FQs en muestras medioambientales es necesario su extracción y preconcentración, por lo que se debe utilizar un método que sea capaz de alcanzar límites de detección y cuantificación muy bajos. Para ello, se puede emplear la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), que eliminará la matriz de la muestra y al mismo tiempo, permitirá la preconcentración de los analitos de interés. Entre las diversas maneras de implementar la SPE (por ej., resina empaquetada en columna, resina dispersa, membranas), en los últimos años se ha desarrollado la SPE soportada en dispositivos. Si bien en los inicios se usaron distintos materiales de laboratorio (barras agitadoras, puntas de pipetas), en la actualidad y gracias al desarrollo de la impresión 3D, se diseñan y fabrican dispositivos impresos en 3D que luego son recubiertos por resinas de SPE que permiten la extracción y posterior preconcentración de los analitos de interés ⁴.

La impresión 3D o “*additive manufacturing*” consiste en la construcción de un objeto en 3 dimensiones (3D) a partir de un modelo diseñado digitalmente, normalmente mediante la adición de una capa sobre otra capa de un material determinado.

En este trabajo de fin de grado (TFG), se ha trabajado con la impresión 3D estereolitográfica (SLA, por sus siglas en inglés) que consiste en irradiar con láser una resina fotocurable. Esta resina, al ser expuesta al láser, sufre una reacción química para pasar a estado sólido, lo que se denomina fotopolimerización (Figura 2).

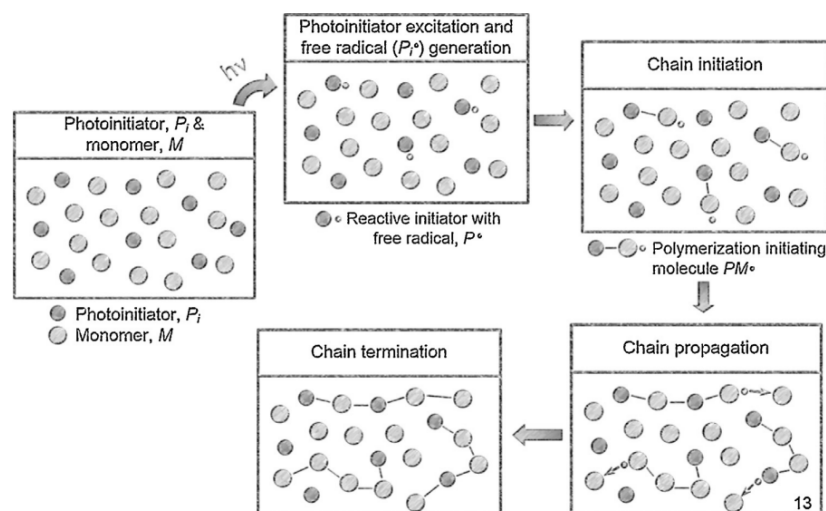


Figura 2. Mecanismo de la reacción de fotopolimerización.⁵

Se ha elegido este proceso de impresión debido a que en comparación con otras técnicas presenta una alta resolución y buen acabado de superficie. Además, los tiempos de impresión son cortos y permite el uso de materiales diversos. El principal inconveniente es que requiere de procesos de tratamiento una vez ha finalizado la impresión.

En la actualidad, la impresión 3D es una tecnología que se encuentra cada vez en más áreas y disciplinas. Su aplicabilidad está en constante aumento debido a la gran inversión en investigación que se realiza en este campo. En el área de Química Analítica se encuentra en muchos ámbitos, tales como la electroquímica donde se usa para circuitos electrónicos impresos o en espectroscopía para la fabricación de diferentes partes del espectrofotómetro. También se usa en dispositivos de microfluidos, una disciplina importante para tratar con cantidades muy pequeñas de líquidos, incluso en cromatografía, para crear lechos cromatográficos ⁶.

1.3 Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FL)

Para determinar FQs se utilizan técnicas de separación cromatográficas acopladas a técnicas de detección con elevada sensibilidad, ya que se encuentran en concentraciones muy bajas en muestras medioambientales.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica utilizada para separar componentes de una mezcla fundamentándose en las interacciones químicas de los analitos con la fase estacionaria y con la fase móvil. Dependiendo de si la sustancia presenta más afinidad por la fase estacionaria o por la fase móvil, variará su tiempo de retención. En la Figura 3 se muestra un esquema básico de la instrumentación requerida para usar un HPLC.

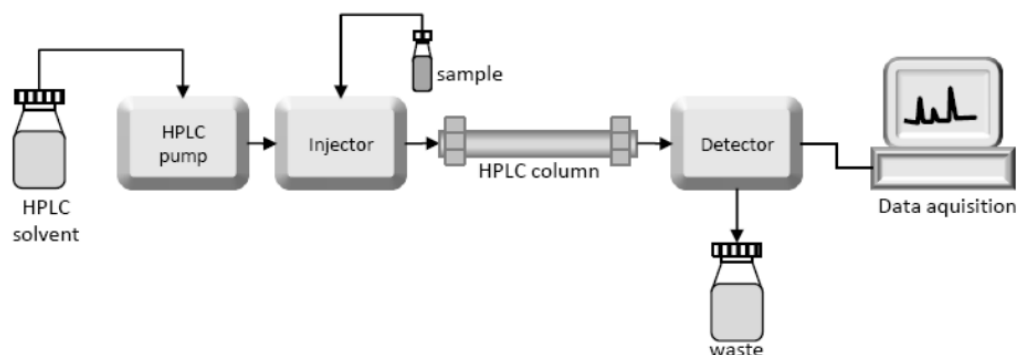


Figura 3. Diagrama de un HPLC ⁷.

Una vez los analitos han sido separados entran en el detector, donde se produce una señal analítica proporcional a su concentración, por lo que sirven tanto para identificarlos como para cuantificarlos. Entre los tipos de detectores existentes, en este trabajo se ha utilizado un detector de fluorescencia (FL) dado que las FQs tienen fluorescencia nativa. La detección se fundamenta en la excitación de cada molécula a una longitud de onda determinada, que emite radiación electromagnética, que es detectada por el detector de fluorescencia.

2. Objetivos

El objetivo general de este TFG es desarrollar un dispositivo impreso en 3D recubierto con una resina de extracción en fase sólida que permita extraer fluoroquinolonas a niveles traza de una matriz acuosa y determinarlas posteriormente mediante HPLC-FL.

Para cumplir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- a) diseñar e imprimir en 3D un dispositivo con una determinada geometría que tenga una elevada área superficial que será recubierta por las resinas de extracción y que permita la extracción eficiente de los analitos
- b) recubrir el dispositivo 3D con diferentes resinas de extracción en fase sólida comerciales, y seleccionar la óptima para extraer las fluoroquinolonas
- c) establecer los factores de enriquecimiento y los porcentajes de extracción de las fluoroquinolonas, sus curvas de calibración sin y con extracción mediante el método propuesto y finalmente, calcular los límites de detección y cuantificación empleando HPLC-FL.

3. Materiales y métodos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Los patrones de Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacina (CIP), Danofloxacina (DAN), Enrofloxacina (ENR), Difloxacina (DIF), Ácido Oxolínico (OXO) y Flumequina (FLU) se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) con una fracción de masa mínima de pureza $\geq 98\%$. El agua desionizada se obtuvo del sistema de purificación Milli-Q Direct-8 (Millipore Ibérica, Madrid, España).

El acetonitrilo (grado HPLC), el metanol, isopropanol y el ácido fórmico para el análisis cromatográfico y la extracción de FQs, se obtuvieron de Scharlab (Barcelona, España). Las disoluciones estándar madre de cada analito se prepararon en metanol y se almacenaron en

una botella ámbar a 4°C. Diariamente se prepararon mezclas de disoluciones de trabajo estándar diluyendo el volumen apropiado de disolución madre de las FQs con agua Milli-Q a las concentraciones requeridas para llevar a cabo los ensayos de extracción utilizando el dispositivo impreso en 3D propuesto.

Para la fabricación del dispositivo 3D se utilizó resina de impresión Clear V4 (FLGPCL04, Formlabs Inc, EE. UU.) compuesta por monómeros/oligómeros de metacrilato.

Se probaron resinas SPE comerciales de diferente composición como: C18 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), SDB-1 (resina de estireno-divinilbenceno) de Bakerbond TM SPE (Avantor, Gliwice, Polonia), Oasis HLB y Oasis MCX (Waters, Milford, MA, EE. UU.).

3.1 Diseño e impresión del dispositivo 3D

En primer lugar, se debe diseñar el dispositivo que se va a usar para la extracción en fase sólida y el cual se impregnará con las resinas de extracción. Para el diseño se ha usado el software Rhinoceros 7.0 SR28 (McNeel & Associates). Este programa permite crear curvas NURBS (B-splines racionales no uniformes), de superficies y sólidos.

Para el diseño del dispositivo se tendrá en cuenta que tenga una elevada área superficial que será recubierta por las resinas de extracción y que permita una extracción eficiente de los analitos, es decir, que la muestra sin ningún tratamiento previo pueda penetrar en el dispositivo fácilmente sin ocluirlo, tal que permita una elevada transferencia de masa del analito para que quede retenido. Además, el dispositivo debe incluir una pieza en la parte superior para el acoplamiento del dispositivo al eje de un equipo que permita la rotación del dispositivo 3D en la muestra.

A continuación, se debe imprimir el dispositivo en 3D, por lo que, una vez diseñada la pieza, se procede a imprimirla.

En la Figura 4 se muestra en esquema de los pasos realizados, desde el diseño a la impresión de los dispositivos.

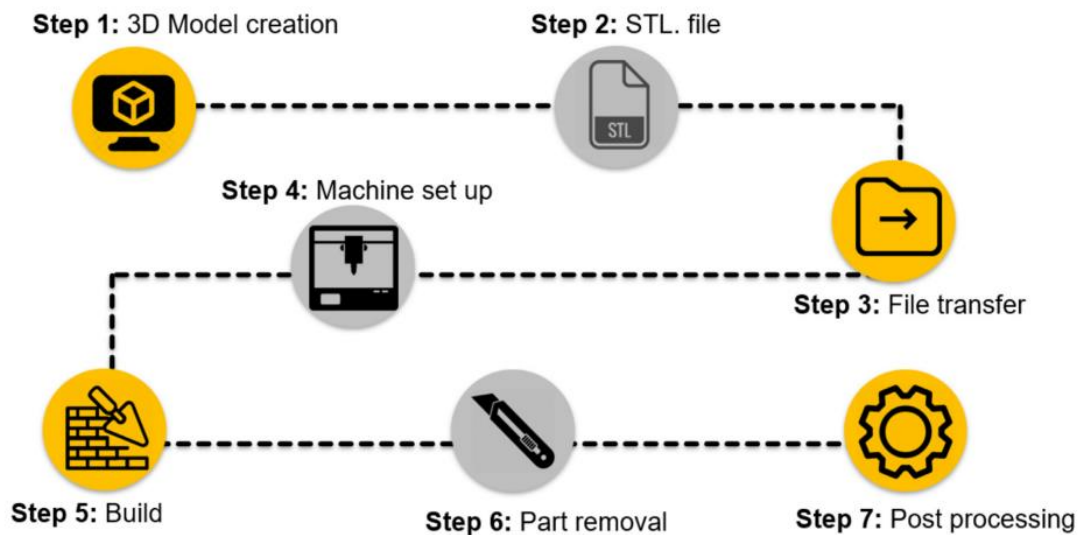


Figura 4. Etapas del diseño e impresión 3D ⁸.

3.2 Impregnación con resinas de extracción

Como se ha mencionado anteriormente, debido a la técnica de impresión SLA utilizada, la resina solidificada requiere de un proceso de curado para que el material acabe de fotopolimerizar. En los casos que se requiere impregnar la pieza con las resinas de extracción, las etapas de curado e impregnación se realizan simultáneamente. Por el contrario, cuando no se requiere el recubrimiento se realiza únicamente la etapa de curado.

Una vez finalizado el proceso de impresión, se retiran los dispositivos de la base de impresión mediante una espátula, y se introducen en un baño de isopropanol durante aproximadamente 1 min. Los dispositivos vienen sujetos a la base de impresión mediante soportes generados por el mismo programa de diseño. Después del tratamiento con isopropanol se deben retirar estos soportes con la ayuda de unas pinzas o una espátula.

Después, con el objetivo de eliminar el isopropanol remanente, se le aplica una corriente de nitrógeno gas, procurando que el dispositivo se seque, pero manteniendo cierto carácter adhesivo para ayudar a que la resina se impregne con mayor facilidad. En un tubo de plástico con tapa de rosca, se añade una cierta cantidad de la resina de extracción en fase sólida, se introduce el dispositivo, que ya ha sido secado, y se agita manualmente durante aproximadamente 1 min.

Finalmente, se introducen los dispositivos recubiertos durante 6 h en un equipo de curado, CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, que genera radiación UV configurado a 365 nm. A esta

longitud de onda la resina adquiere más resistencia que mejora su posterior uso. Este procedimiento se denomina “stick and cure”⁹.

3.3 Selección de la resina de extracción

Se realizaron ensayos con 4 resinas de extracción en fase sólida con el fin de seleccionar la que presenta mayores porcentajes de extracción. Las resinas con las que se trabajó fueron Oasis HLB, Oasis MCX, C18, y SDB-1, siguiendo las recomendaciones del fabricante para el acondicionamiento de las mismas, y para la retención y elución de los analitos.

Para realizar este estudio se preparó una disolución conteniendo 50 ppb de cada una de las siete FQs, para lo cual se impregnaron dos dispositivos con cada una de las resinas de SPE.

Para realizar el proceso de retención, en primer lugar, se introdujo un dispositivo recubierto en un tubo de plástico con 3 mL de metanol durante 1 min, para acondicionar la resina de extracción y alcanzar las propiedades óptimas de extracción.

El dispositivo recubierto se acopla a un instrumento (Figura 5) que permite rotar la pieza a unas revoluciones determinadas (RW 20 digital, IKA).



Figura 5. Esquema de acoplamiento del dispositivo impreso al rotor.

En un vaso de precipitados, se introducen 50 mL de la disolución patrón de las siete FQs. El dispositivo 3D recubierto acoplado al RW 20 se introduce en la disolución y se deja en agitación 30 min a 315 rpm.

Finalizado este tiempo, se realiza la etapa de elución de las FQs que han quedado retenidas en el dispositivo, para analizarlas en el HPLC-FL. Para ello, se utilizó un sistema automático compuesto por un módulo de jeringa (Multi-Burette 4S, Crison) para impulsar los líquidos a un flujo determinado, una válvula de selección (8-ports Selection valve, Crison) que permite dirigir los líquidos, y tubería de teflón (Figura 6). Como eluyente se han utilizado 3 mL metanol a $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

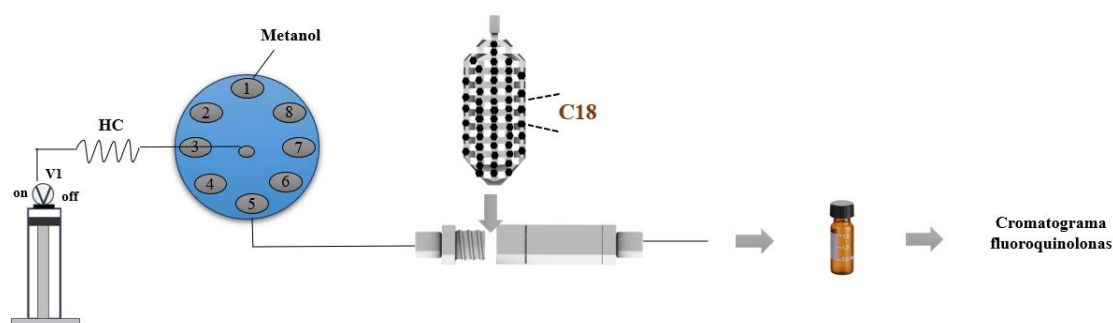


Figura 6. Diagrama del sistema automatizado de elución.

Finalmente, se recogen los eluatos en viales de vidrio. Con el fin de evaluar la eficiencia de todo el proceso conjunto de extracción, es decir, considerando las etapas de retención y elución de los analitos, se analizarán mediante HPLC-FL, tanto las disoluciones de patrones después de ser extraídas, como los eluatos. De esta manera, se podrá establecer individualmente si se realizan con éxito las etapas de retención y elución. Con estos resultados se seleccionará la resina de SPE que presente los mejores porcentajes de extracción.

3.4 Optimización del caudal de elución

Una vez seleccionada la resina de extracción, se optimizó el flujo de metanol durante la etapa de elución. Para ello se realizaron dos curvas de calibrado empleando el método propuesto, con diferentes flujos de elución (0.3 y $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

3.5 Separación cromatográfica y factores de enriquecimiento y preconcentración

La separación cromatográfica se realizó en un HPLC Vanquish (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) equipado con una bomba cuaternaria (VF-P20-A), un detector de fluorescencia (VF-D50-A) y el software Chromeleon para la adquisición de datos. La separación cromatográfica se

llevó a cabo con una columna Symmetry® C18 de 4,6 x 250 mm (diámetro x longitud), y tamaño de partícula de 5 µm (Waters). La fase móvil consistía en agua Milli-Q a pH 2.8 con ácido fórmico (eluyente A) y acetonitrilo de grado HPLC (eluyente B). Las condiciones de elución en gradiente comenzaron con 91% de A y 9% de B durante 8 min (de 0 a 8 min), seguidas de una disminución al 88% de A y un aumento al 12% de B durante 7 min (de 8.01 a 15 min). A continuación, se aumentó al 48% la fase móvil B por 7 min (de 15.01 a 22 min) y llegando al 90% de B hasta 28 min. Finalmente, la columna se equilibró durante 7 min, por lo que el tiempo total de ejecución del análisis fue de 35 min. La longitud de onda de detección de excitación/emisión se fijó en 280/450 nm para NOR, CIP, DAN, ENR, DIF, mientras que a 320/365 nm para OXO y FLU. El volumen de inyección fue de 20 µL y el caudal de la fase móvil se fijó en 0.6 mL min⁻¹. Además, tanto la temperatura de la columna como la del automuestreador se ajustaron a 35 y 4 °C, respectivamente.

Los factores de enriquecimiento (FE) se obtienen dividiendo la pendiente obtenida en la curva de calibración interna (m_{interna} , extraída con el dispositivo propuesto) entre la pendiente de la curva de calibración externa (m_{externa}).

$$FE = \frac{m_{\text{interna}}}{m_{\text{externa}}}$$

De esta manera, se puede cuantificar el aumento de la concentración de los analitos, y, por lo tanto, el aumento de la señal analítica que comporta una mejora de los resultados del método propuesto.

El porcentaje de extracción se calcula como la relación entre el factor de enriquecimiento (FE) y el factor de preconcentración (FP), siendo este último el cociente entre el volumen de muestra inicial (50 mL) y el volumen final de eluyente (3 mL). Finalmente, el resultado se multiplica por cien para obtener el tanto por ciento de extracción.

$$\% \text{ Extracción} = \frac{FE}{FP} \cdot 100$$

3.6 Curvas de calibrado y límites de detección y cuantificación

Se preparó inicialmente una disolución madre de 100 ppm de cada una de las siete FQs. Es importante recalcar que la disolución madre se almacenó en nevera, y se utilizó la misma para todos los ensayos.

Se realizaron curvas de calibración con disoluciones patrón de 5, 10, 50, 100, 300, 500, 1000 y 2000 ppb en matraces aforados de 25 mL. De esta manera, se identifican mediante los tiempos de retención de los picos correspondientes, a cada uno de los siete analitos.

Para determinar los límites de detección y de cuantificación (LOD y LOQ) se analizaron 10 blancos de reactivos. Dado que en todo momento se analizan las FQs en una matriz acuosa se usó agua Milli-Q para los blancos. Los límites se calcularon según las ecuaciones:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{blanco}}{m} \qquad LOQ = \frac{10 \cdot s_{blanco}}{m}$$

Donde “m” es la pendiente de la curva de calibrado (con extracción) y “s_{blanco}” es la desviación estándar de la señal analítica de los blancos.

3.7 SEM

Con el objetivo de evaluar la superficie de los dispositivos recubiertos con la resina de extracción en diferentes fases del ensayo, se obtuvieron imágenes mediante SEM (*Scanning Electron Microscopy*) usando un microscopio Hitachi S-3400 (Tokio, Japón).

Para ello, se obtuvieron imágenes de dispositivos en las siguientes fases:

- 1) Dispositivo impreso en 3D sin recubrir
- 2) Dispositivo impreso en 3D después de la impregnación con resina C18
- 3) Dispositivo impreso en 3D impregnado con C18 después de la extracción

Las muestras que ya habían sido usadas se deben secar, ya que el método requiere de la ausencia de agua, ya que puede causar interferencias y se obtendría una mala imagen.

4. Resultados y discusión

4.1 Diseño e impresión del dispositivo 3D

Dado que en el grupo de investigación de Química Analítica Ambiental se han diseñado y aplicado previamente diferentes geometrías para la extracción de fármacos, se disponía de varias opciones. Los diferentes diseños consistían en una unidad estructural de una determinada geometría repetida en las tres direcciones del espacio, formando una especie de prisma. Las diferentes unidades consisten en tetraedros, cuboides, octaedros o esferas entre

otras. Se decidió usar los cuboides debido a que presentan una mayor superficie específica que el resto de los diseños, lo que permite obtener mayores eficiencias de extracción. Los canales que presenta en su interior permiten la interacción entre el analito y la resina de extracción, evitando obstrucciones ⁹.

El diseño consiste en dos capas diferentes de prismas rectangulares con una zona lateral de forma cilíndrica y las partes superior e inferior de geometría cónica. Las dos capas consisten en 5 prismas en la dirección del eje X y otra capa encima con 5 prismas en la dirección del eje Y (Figura 7). Este patrón se repite a lo largo del eje Z un total de 11 veces. El proceso de impresión tuvo una duración de 2.5 h. En cada proceso de impresión, se han impreso 9 dispositivos a la vez, aprovechando el máximo espacio disponible para incrementar la eficiencia de la impresión.

Dado que para realizar las extracciones se debe acoplar el dispositivo a un rotor, se ha diseñado una pieza para poder encajarlo al equipo (Figura 8).

Con el fin de realizar la elución de forma automatizada, se diseñó e imprimió en 3D una pieza que contenga al dispositivo 3D recubierto, con una tapa con rosca donde se pudiese introducir el dispositivo, y acoplarlo al sistema de elución.

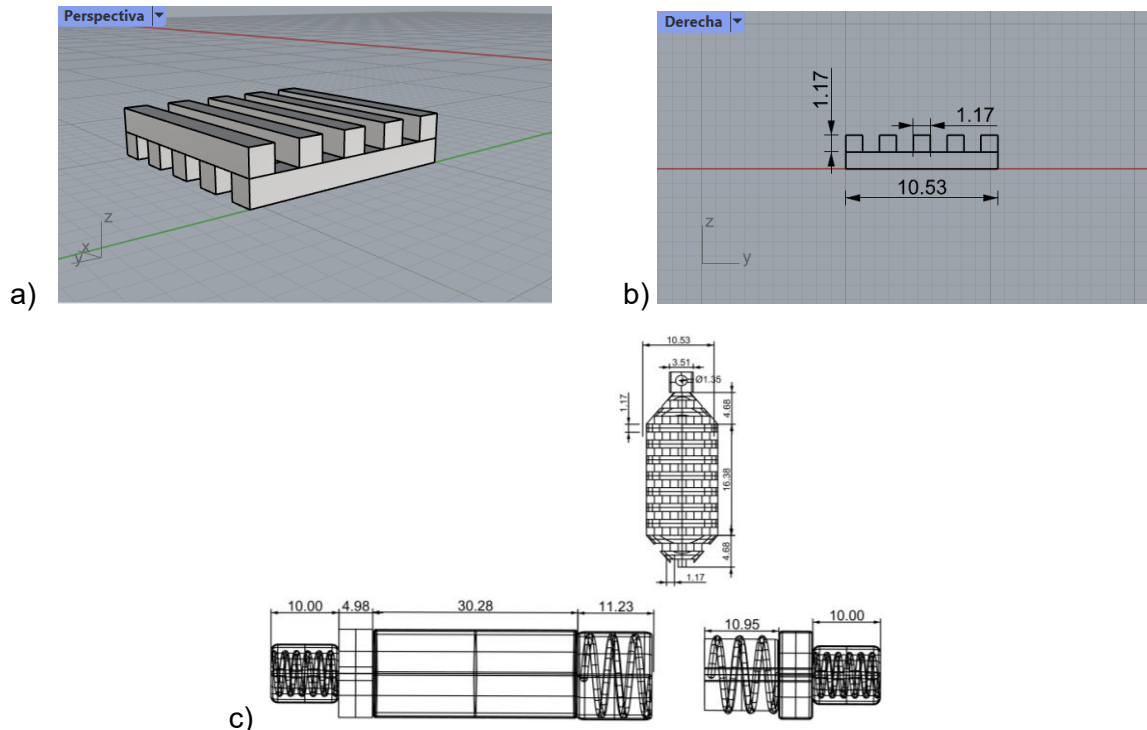


Figura 7. a) Diseño de los cuboides; b) Dimensiones de los cuboides y de los canales interiores; c) Diseño y dimensiones del dispositivo completo y del soporte del dispositivo.

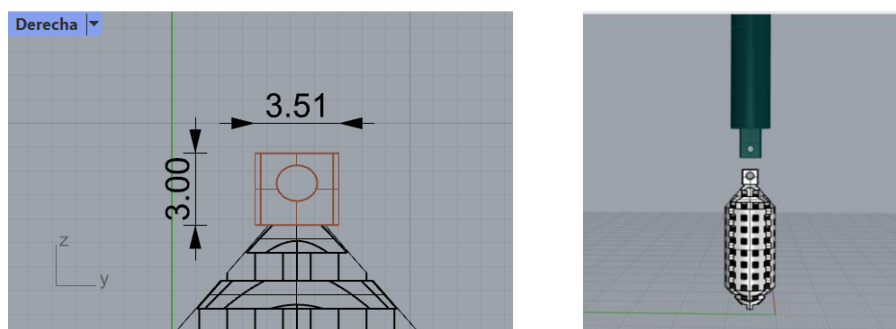


Figura 8. Diseño y dimensiones del adaptador del rotor.

4.2 Selección de la resina de extracción en fase sólida

Una vez finalizada la impresión 3D de los dispositivos, se procedió a realizar la etapa de revestimiento con resinas de extracción en fase sólida. Con el fin de seleccionar aquella que presente mayores porcentajes de extracción, se probaron 4 resinas diferentes: Oasis HLB, Oasis MCX, SDB-1 y C18. Se impregnaron dos dispositivos con cada una, y se procedió a la extracción de una disolución de 50 ppb de cada una de las FQs. Los eluatos se analizaron mediante HPLC-FL.

Los resultados se han expresado como las intensidades relativas de las áreas de los picos, dividiendo el área de cada pico de un analito entre el valor máximo del área del pico obtenido con las 4 resinas. Así, los resultados se expresan entre 0 y el 1, lo que permite una rápida comparación entre todos los resultados (Figura 9). Se puede observar que para las siete FQs, la resina que presenta una mejor extracción es la C18, presentando todos los valores máximos de extracción, siendo el mayor porcentaje un 57.9% para OXO y el mínimo un 7.6% para NOR. La resina Oasis MCX funciona bien para OXO y FLU (57.3 y 41.8%, respectivamente), pero no extrae prácticamente el resto de los analitos. La resina Oasis HLB extrae todas las FQs, pero con menores porcentajes que la C18, resultando en un 36.6% como valor máximo para FLU y 2.9% como porcentaje mínimo para CIP. Finalmente, la resina SDB-1 ha sido la que ha proporcionado peores resultados, ya que prácticamente no ha extraído ningún analito.

En conclusión, se ha determinado que la resina C18 es la que presenta una mejor extracción de las FQs. Esto se debe a que la resina C18 se caracteriza por tener grupos no polares y por lo tanto aumenta su rendimiento en la extracción de analitos de baja polaridad ¹⁰. En este caso concreto, las FQs presentan una polaridad media a baja, siendo probablemente este motivo que permitan que se obtengan los mejores resultados de extracción con esta resina. Por otro

lado, la resina Oasis HLB funciona mejor con sustancias de polaridad intermedia, por lo que se refleja un menor rendimiento.

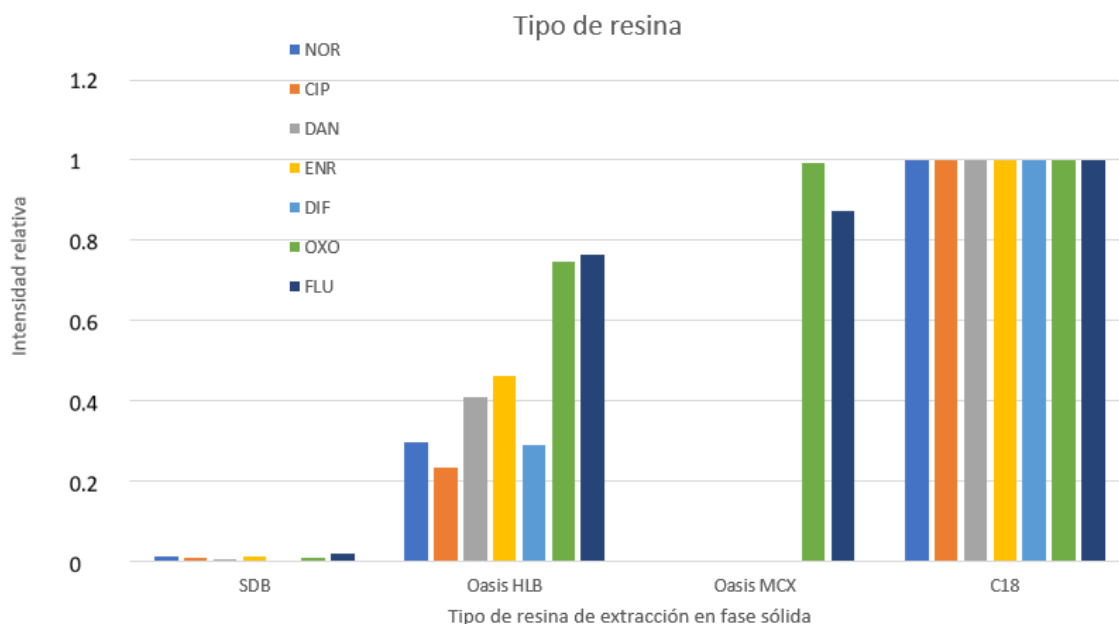


Figura 9. Intensidades relativas de la extracción de una disolución de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 7 fluoroquinolonas para las resinas de extracción SDB-1, Oasis HLB, Oasis MCX y C18. Norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), danofloxacino (DAN), enrofloxacina (ENR), difloxacino (DIF), ácido oxolínico (OXO), y ofloxacino (FLU).

4.3 Evaluación de la impregnación

Una vez seleccionada la resina de extracción C18, se procedió a realizar una evaluación del grado y calidad de la impregnación.

Para determinar si el revestimiento ha sido efectivo se realizó un análisis gravimétrico, midiendo las masas de los dispositivos antes y después del recubrimiento. Así, se obtuvo por diferencia la masa de resina impregnada. Se midieron 9 dispositivos impresos en la misma tanda y se usó una balanza con una precisión de $\pm 0.001 \text{ g}$ (Tabla 1).

La masa promedio de los dispositivos impresos ha sido de $1.339 \pm 0.007 \text{ g}$ por lo que se puede concluir que la técnica de impresión proporciona una elevada precisión. Los dispositivos se impregnaron con un promedio de $0.035 \pm 0.016 \text{ g}$ de resina C18, una cantidad suficiente para realizar las extracciones de las siete FQs a las concentraciones ensayadas. Sin embargo, se observó una gran desviación estándar para el método de recubrimiento “stick and cure”. Para posteriores ensayos se descartaron las piezas recubiertas con menos de 0.035 g de resina.

Tabla 1. Masas de los dispositivos 3D antes y después del proceso de impregnación con resina C18.

Dispositivo 3D sin impregnar		Dispositivo 3D impregnado		
Dispositivo	Masa (g)	Dispositivo	Masa (g)	Masa resina (g)
1	1.340	1	1.371	0.031
2	1.337	2	1.390	0.053
3	1.334	3	1.394	0.060
4	1.344	4	1.372	0.028
5	1.336	5	1.382	0.046
6	1.326	6	1.368	0.042
7	1.351	7	1.368	0.017
8	1.344	8	1.357	0.013
9	1.342	9	1.368	0.026
Promedio ± desviación estándar	1.339 ± 0.007	Promedio ± desviación estándar	1.374 ± 0.012	0.35 ± 0.016

Con el objetivo de evaluar la calidad de la impregnación, se tomaron imágenes mediante microscopia SEM para observar en detalle el grado de adherencia de la resina C18 al dispositivo. Se observó un buen recubrimiento de toda la pieza, incluso dentro de los canales del dispositivo. Sin embargo, después de la extracción, se pierde parte del recubrimiento de las paredes laterales, aunque dentro de los huecos la resina continúa adherida (Figura 10).

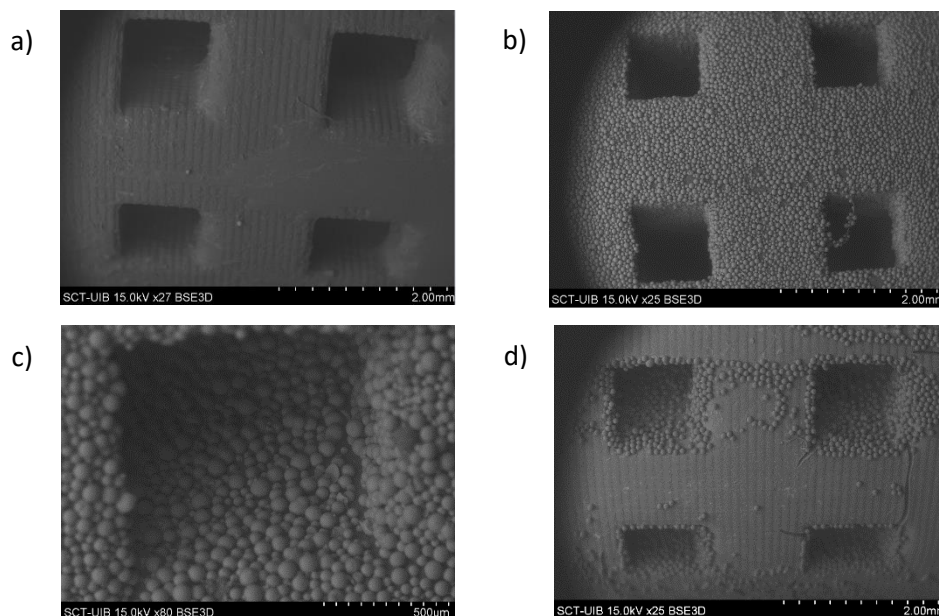


Figura 10. Imágenes SEM del dispositivo sin impregnar (a), dispositivo impregnado (b), canal del dispositivo impregnado (c) y dispositivo impregnado después de la extracción (d).

4.4 Elución

A continuación, se procedió a optimizar la etapa de elución mediante un sistema automatizado. Se estudiaron dos flujos de metanol diferentes, 0.3 y 1 mL·min⁻¹. Se observó una mejora considerable del flujo de 0.3 mL·min⁻¹ respecto a 1 mL·min⁻¹ (Figura 11). Estos resultados se deben a que un flujo menor proporciona más tiempo de contacto entre la resina de extracción y el eluyente, favoreciendo la transferencia de masa de los analitos al eluato.

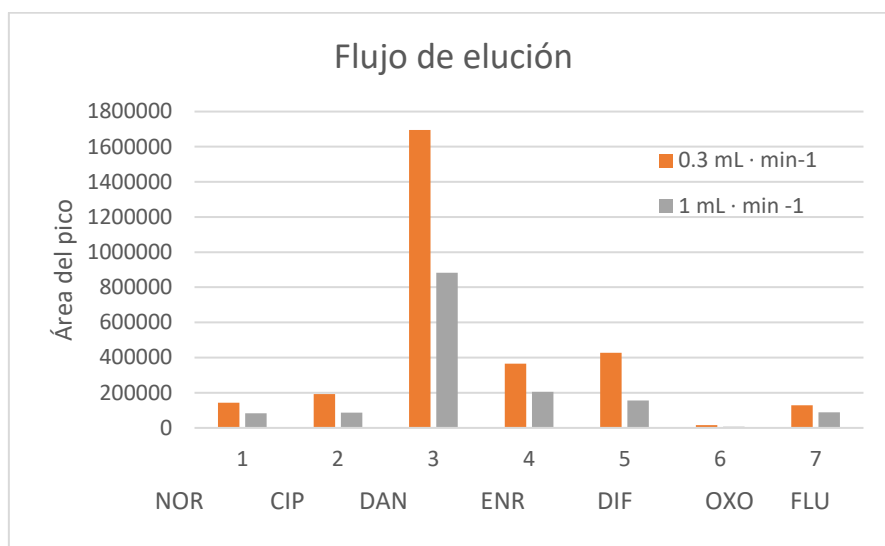


Figura 11. Área de los picos de una disolución de 50 µg·L⁻¹ de 7 FQ para dos flujos de elución. Norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), danofloxacino (DAN), enrofloxacin (ENR), difloxacino (DIF), ácido oxolínico (OXO), y ofloxacino (FLU).

Como resultado de esta etapa de optimización, para posteriores ensayos se utilizó la resina de extracción C18 y un flujo de eluyente de 0.3 mL·min⁻¹. Los restantes parámetros de extracción se eligieron en base a estudios anteriores⁹.

4.5 Cromatogramas y factores de enriquecimiento y preconcentración

Como se puede observar en el cromatograma de la Figura 12, cinco FQs (NOR; CIP; DIF; OXO; FLU) presentaron una muy buena separación, a excepción de DAN y ENR, en las que se debe seguir optimizando la separación cromatográfica para alcanzar una buena resolución. También se observa un pequeño pico después del pico de DIF debido al metanol.

Se han comparado los cromatogramas de la disolución resultante de la extracción (eluato) y de la disolución de la cual se han extraído las FQs (remanente). Se pueden observar los picos en la disolución eluida, indicando que ha efectuado una extracción de los analitos (Figura 13).

Por otro lado, no se observa ningún pico en la disolución remanente, evidenciando que se han extraído prácticamente la totalidad de los analitos.

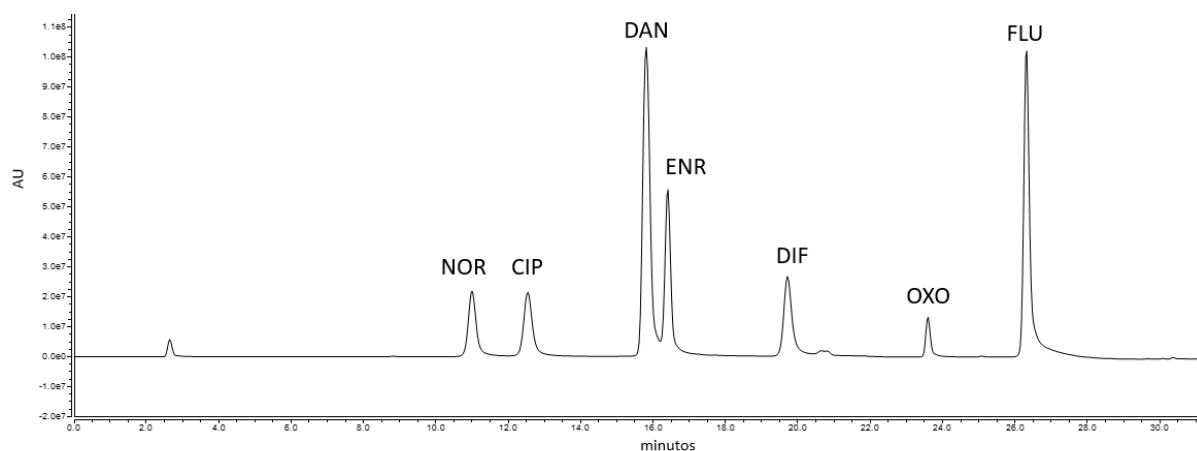


Figura 12. Cromatograma de la disolución patrón de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de las 7 FQs estudiadas. Norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), danofloxacin (DAN), enrofloxacin (ENR), difloxacin (DIF), ácido oxolínico (OXO), y ofloxacin (FLU).

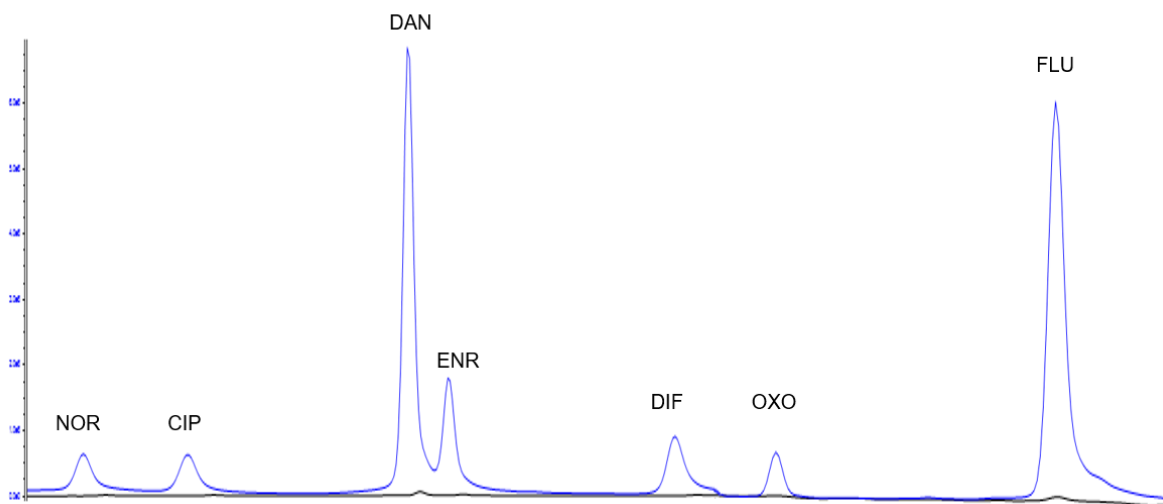
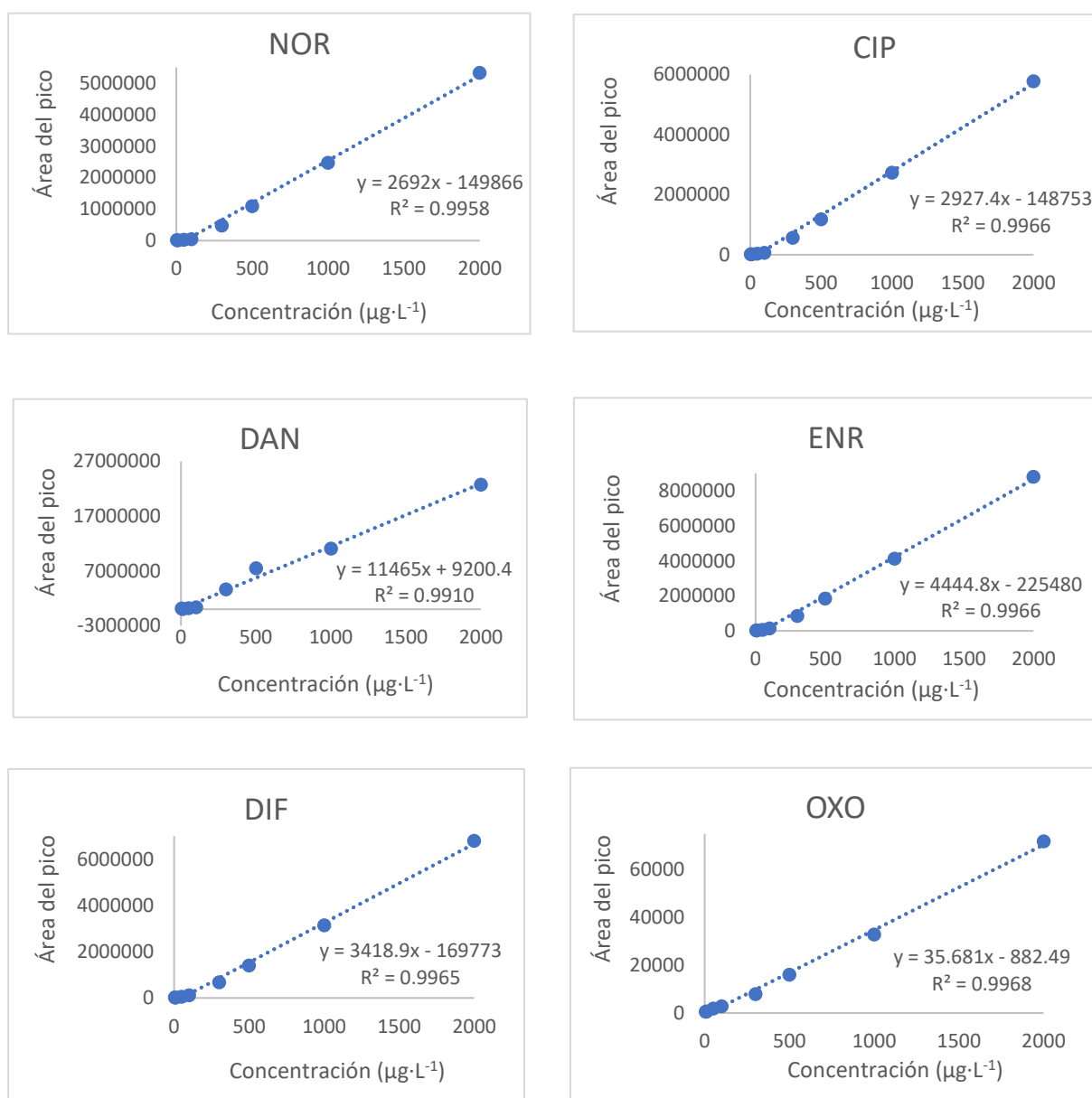


Figura 13. Cromatogramas superpuestos de la disolución eluida con la resina C18 (azul) y de la disolución remanente (negro) después de la extracción. Norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), danofloxacin (DAN), enrofloxacin (ENR), difloxacin (DIF), ácido oxolínico (OXO), y ofloxacin (FLU).

4.6 Curvas de calibrado

Por último, se realizaron curvas de calibrado con las disoluciones patrón de las siete FQs estudiadas con el objetivo de establecer el rango lineal, y los límites de detección de cuantificación y el porcentaje de extracción comparando las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas con y sin extracción. Se utilizaron concentraciones en un intervalo de 5 – 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y se determinaron mediante HPLC-FL. Se observó un buen ajuste lineal con valores de $R^2 > 0.99$ en todos los casos. Se realizaron 3 réplicas de cada patrón y se representó el promedio de las áreas de los picos frente a su concentración (Figura 14). Las áreas de los picos y sus desviaciones estándar se muestran en la Tabla 2.



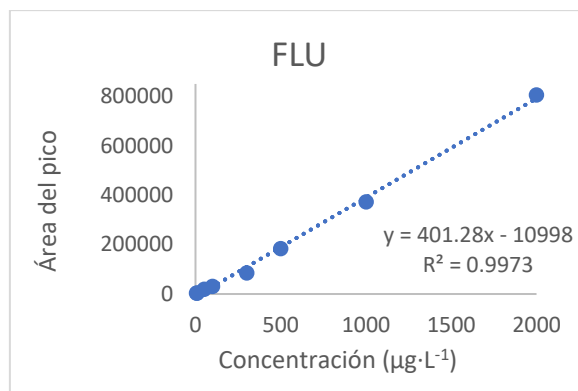


Figura 14. Curvas de calibrado externas (sin extracción) de disoluciones patrón de las 7 fluoroquinolonas en un rango de concentraciones de 5 – 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Norfloxacino (NOR), ciprofloxacino (CIP), danofloxacino (DAN), enrofloxacina (ENR), difloxacino (DIF), ácido oxolínico (OXO), y ofloxacino (FLU).

Tabla 2. Áreas de los picos de las fluoroquinolonas Norfloxacino (NOR), Ciprofloxacino (CIP), Danofloxacino (DAN), y Enrofloxacina (ENR) a diferentes concentraciones de la curva de calibrado sin extracción (área del pico \pm desviación estándar, n=2).

Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Áreas de los picos			
	NOR	CIP	DAN	ENR
5	12169 \pm 212	18223 \pm 631	126573 \pm 839	26970 \pm 901
10	15856 \pm 707	15094 \pm 760	37867 \pm 283	14610 \pm 501
50	28126 \pm 53	36331 \pm 89	151757 \pm 2387	53216 \pm 813
100	49606 \pm 169	69230 \pm 101	337419 \pm 7532	131900 \pm 1922
300	479186 \pm 222	568759 \pm 656	3617417 \pm 10537	844386 \pm 4013
500	1096297 \pm 2936	1186914 \pm 4554	7458204 \pm 8290	1834422 \pm 7845
1000	2475110 \pm 3049	2738619 \pm 9935	11059232 \pm 11987	4118018 \pm 10271
2000	5324523 \pm 3117	5783779 \pm 2272	22744947 \pm 98156	8796428 \pm 9736
Tiempo de retención (min)	11	12.6	15.8	16.4

Tabla 2 (continuación). Áreas de los picos de las fluoroquinolonas Difloxacino (DIF), Ácido oxolínico (OXO), y ofloxacino (FLU) a diferentes concentraciones de la curva de calibrado sin extracción (área del pico \pm desviación estándar, n=2).

Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Área de los picos		
	DIF	OXO	FLU
5	19871 \pm 374	451 \pm 11	3429 \pm 23
10	16136 \pm 901	587 \pm 32	3429 \pm 99
50	50703 \pm 712	1876 \pm 88	18905 \pm 961
100	116126 \pm 776	2739 \pm 106	30708 \pm 537
300	673848 \pm 2334	7944 \pm 98	85257 \pm 863
500	1395008 \pm 61021	16021 \pm 202	183552 \pm 2579
1000	3139223 \pm 55011	32873 \pm 816	372735 \pm 2155
2000	6786791 \pm 93716	71921 \pm 151	805061 \pm 21767
Tiempo de retención (min)	19.7	23.2	26.3

Una vez realizadas las curvas de calibrado externas (sin extracción), se realizaron curvas de calibrado internas (utilizando el dispositivo de extracción) que se muestran en la Figura 15, con el objetivo de determinar el factor de enriquecimiento y el porcentaje de extracción de cada FQ. Se llevaron a cabo las extracciones con la resina C18 y con los parámetros descritos anteriormente. Se estudiaron concentraciones de 0.1 – 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se observa un buen ajuste lineal, donde $R^2 > 0.99$ excepto para CIP, que fue de 0.9833. Todas las pendientes son mayores, en algunos casos el doble y en otros hasta 10 veces superiores, que en la curva de calibrado externa, lo que indica que se ha realizado una preconcentración con éxito. Las áreas de los picos y sus desviaciones estándar se muestran en la Tabla 3.

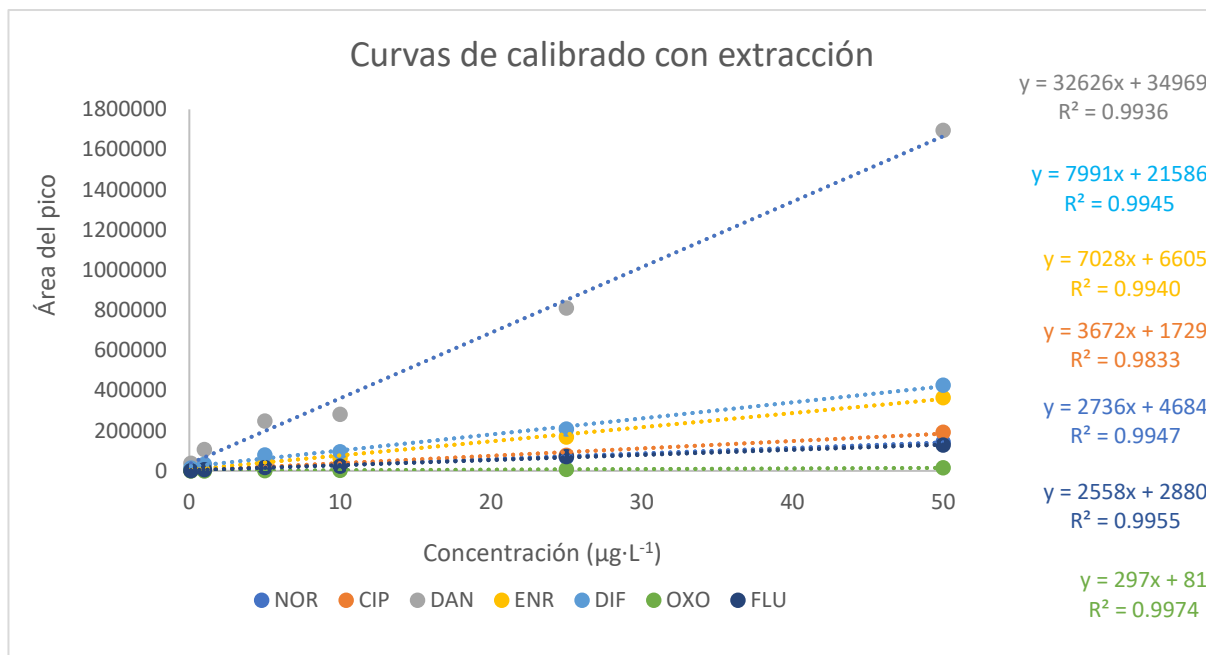


Figura 15. Curvas de calibrado de las 7 FQ empleando el método de extracción propuesto en un rango de concentraciones de $0.1 - 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), danofloxacino (DAN), enrofloxacina (ENR), difloxacino (DIF), ácido oxolínico (OXO), y ofloxacino (FLU).

Tabla 3. Áreas de los picos de las fluoroquinolonas Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacino (CIP), Danofloxacino (DAN), y Enrofloxacina (ENR) a diferentes concentraciones de la curva de calibrado con extracción (área del pico \pm desviación estándar, $n=2$).

Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Áreas de los picos			
	NOR	CIP	DAN	ENR
0.1	2709 \pm 58	1754 \pm 71	31153 \pm 65	6518 \pm 159
1	4417 \pm 670	3323 \pm 564	36560 \pm 184	9305 \pm 225
5	6519 \pm 664	7107 \pm 1010	61374 \pm 1606	14636 \pm 49
10	13918 \pm 887	14384 \pm 514	137999 \pm 1230	31685 \pm 132
25	31386 \pm 63	37677 \pm 101	281284 \pm 530	66205 \pm 36
50	83272 \pm 40	86396 \pm 65	883282 \pm 254	206178 \pm 455
Tiempo de retención (min)	11	12.6	15.8	16.4

Tabla 3 (continuación). Áreas de los picos de las fluoroquinolonas Difloxacino (DIF), Ácido oxolínico (OXO), y ofloxacino (FLU) a diferentes concentraciones de la curva de calibrado con extracción (área del pico \pm desviación estándar, n=2).

Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Área de los picos		
	DIF	OXO	FLU
0.1	2927 \pm 451	91*	760 \pm 176
1	3731 \pm 98	300 \pm 81	2513 \pm 7
5	12489 \pm 1126	938 \pm 191	8067 \pm 347
10	24212 \pm 1355	1723 \pm 24	16922 \pm 485
25	60212 \pm 111	3780 \pm 28	39416 \pm 22
50	156269 \pm 751	7468 \pm 28	88877 \pm 32
Tiempo de retención (min)	19.7	23.2	26.3

*Valor sin réplica.

4.7 Parámetros analíticos

Se han analizado 10 blancos de reactivos sin extracción, para calcular los LODs y LOQs de de cada FQ sin extracción (empleando la curva de calibrado externa). Estos blancos consistían en agua Milli-Q usada para realizar las disoluciones patrón. También se han analizado 10 blancos de reactivos con extracción empleando el dispositivo 3D recubierto, y realizando todo el proceso de la misma manera que en los otros ensayos, pero sin añadir los analitos a la disolución. De esta manera se puede determinar el LOD y LOQ para cada FQ empleando el método propuesto. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

El factor de preconcentración obtenido como el cociente entre el volumen de muestra de 50 mL y el volumen de eluyente de 3 mL, fue de 16.7.

También se han calculado los factores de enriquecimiento y los porcentajes de extracción de las siete FQs, que se encuentran en un rango de 0.1 – 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabla 5). En el caso de NOR o CIP se han obtenido factores de 1.0-1.6 y 1.0-3.2, respectivamente, donde se observa que se ha enriquecido muy poco, y bajos porcentajes de extracción de 5.4 - 9.8 % y 5.5 - 19.5 %. En el caso de OXO se han obtenido los mejores resultados, con un factor de enriquecimiento entre 7.8 - 11.6 y porcentajes de extracción entre 46.8 - 69.0 %.

Tabla 4. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y sensibilidad obtenidos sin y con extracción previa al análisis con HPLC-FL. Norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), danofloxacino (DAN), enrofloxacina (ENR), difloxacino (DIF), ácido oxolínico (OXO), y ofloxacino (FLU).

FQ	Curva externa (sin extracción)			Curva interna (con extracción)		
	LOD (ng·L ⁻¹)	LOD (ng·L ⁻¹)	Sensibilidad (pendiente curva calibración)	LOD (ng·L ⁻¹)	LOQ (ng·L ⁻¹)	Sensibilidad (pendiente curva calibración)
NOR	1.9	6.4	2692	0.8	2.6	2736
CIP	2.9	9.8	2927	0.7	2.4	3672
DAN	3.2	10.7	11465	0.1	0.4	32625
ENR	0.8	2.6	4445	0.1	0.3	7028
DIF	0.8	2.8	3419	0.2	0.7	7991
OXO	5.3	17.5	36	1.3	4.2	297
FLU	4.8	15.9	401	0.5	1.5	2558

Cabe destacar que, debido a que el análisis de la disolución remanente (posterior a la extracción con el dispositivo 3D) indica que la práctica totalidad de las FQs son retenidas en el dispositivo 3D recubierto, los % de extracción (que en ningún caso alcanza el 100%) son debidos a la poca eficiencia de elución, que deberá ser optimizar con el fin de aumentar los % de extracción. Es decir, el dispositivo retiene los analitos de las muestras prácticamente en su totalidad, pero en la etapa de elución no se consiguen eluir del dispositivo en su totalidad, y en consecuencia se obtienen porcentajes de extracción bajos.

Tabla 5. Factores de enriquecimiento (FE) y porcentajes de extracción (%EX) de las siete FQs en un intervalo de concentraciones de 0.1 – 50 µg·L⁻¹ (n=2). Norfloxacin (NOR), ciprofloxacino (CIP), danofloxacino (DAN), enrofloxacina (ENR), difloxacino (DIF), ácido oxolínico (OXO), y ofloxacino (FLU).

	NOR	CIP	DAN	ENR	DIF	OXO	FLU
FE	1.3 ± 0.3	2.1 ± 1.1	3.3 ± 0.7	1.7 ± 0.2	2.7 ± 0.5	9.7 ± 1.9	8.0 ± 2.3
% EX	7.6 ± 2.2	13 ± 7	20 ± 4	10.3 ± 1.1	16 ± 3	58 ± 11	48 ± 14

5. Conclusiones

Una vez finalizadas todas las etapas del trabajo y obtenidos los resultados, se pueden sacar diversas conclusiones:

- Se ha diseñado e impreso un dispositivo 3D, el cual se ha utilizado satisfactoriamente como soporte de las resinas de extracción en fase sólida.
- Se ha impregnado el dispositivo 3D con 4 resinas de extracción diferentes, resultando la resina C18 la más efectiva para la extracción de las fluoroquinolonas estudiadas.
- Se han establecido los límites de detección y cuantificación y la sensibilidad del método propuesto, para cada una de las fluoroquinolonas. También se han calculado los porcentajes de extracción y los factores de enriquecimiento de las fluoroquinolonas, presentando los mejores resultados para las fluoroquinolonas OXO y FLU. En los casos de CIP, DAN y ENR se obtuvieron niveles de extracción bajos.

En resumen, se han obtenido resultados satisfactorios aplicando el método propuesto, que permite la extracción simultánea para su posterior separación y determinación de siete fluoroquinolonas mediante HPLC-FL. Sin embargo, se deberían optimizar algunos parámetros del proceso de elución para obtener mejores porcentajes de extracción, como tipo de eluyente, su volumen o el pH de retención, ya que se han observado bajos porcentajes extracción para tres de las siete fluoroquinolonas estudiadas, debidos a la etapa de elución, no a la de retención.

6. Bibliografía

- [1] Bhatt, S., & Chatterjee, S. (2022). Fluoroquinolone antibiotics: Occurrence, mode of action, resistance, environmental detection, and remediation – A comprehensive review. *Environmental Pollution*, 315. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120440>
- [2] Andreas H., & Alfredo C. A., (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, pp. 377–382.
- [3] Khetan, S. K., & Collins, T. J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry. In *Chemical Reviews*, 107, Issue 6, pp. 2319–2364. <https://doi.org/10.1021/cr020441w>
- [4] Calderilla, C., Maya, F., Leal, L. O., & Cerdà, V. (2018). Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 108, pp. 370–380). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.011>

- [5] Lee, J. Y., An, J., & Chua, C. K. (2017). Fundamentals and applications of 3D printing for novel materials. In *Applied Materials Today* (Vol. 7, pp. 120–133). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.02.004>
- [6] Seifrtová, M., Pena, A., Lino, C. M., & Solich, P. (2008). Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), pp 799–805. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2020-1>
- [7] Czaplicki, S. (2013). Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. In *Column Chromatography*, pp 100-122. <https://doi.org/10.5772/55620>
- [8] Agrawaal, H., & Thompson, J. E. (2021). Additive manufacturing (3D printing) for analytical chemistry. In *Talanta Open*, 3. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100036>
- [9] Barzallo, D., Palacio, E., March, J., & Ferrer, L. (2023). 3D printed device coated with solid-phase extraction resin for the on-site extraction of seven sulfonamides from environmental water samples preceding HPLC-DAD analysis. *Microchemical Journal*, 190. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108609>
- [10] Southan C. (1987). Use of Sep-Pak cartridges for on-line preparative high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 397, pp 399-404. DOI: [10.1016/s0021-9673\(01\)85024-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)85024-x)
- [11] Dias, N. C., & Poole, C F. (2002). Mechanistic Study of the Sorption Properties of OASIS + HLB and its Use in Solid-Phase Extraction Key Words Column liquid chromatography Solid-phase extraction Solvation parameter model porous polymer Oasis| HLB. In *Chromatographia*, 56, pp 269-275. DOI:[10.1007/BF02491931](https://doi.org/10.1007/BF02491931)
- [12] Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A., & Solich, P. (2009). An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. In *Analytica Chimica Acta*, 649, Issue 2, pp. 158–179. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.031>
- [13] Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. In *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33, Issues 9–12, pp. 1130–1150. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- [14] He, K., Blaney, L. (2015). Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater, *Journal of Hazardous Materials*, 282, pp 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.027>. Haga clic o pulse aquí para escribir texto.