



Universitat
de les Illes Balears



**Centro de Investigación en
Materiales Avanzados S.C.**

TESIS DOCTORAL

Avances en la determinación de metales basados en la técnica de análisis en flujo multijeringa e impresión 3D

Carlos Mauricio Calderilla Jaime

2018

Carlos M. Calderilla.

Firma del autor

Carlos Mauricio Calderilla Jaime



Universitat
de les Illes Balears



**Centro de Investigación en
Materiales Avanzados S.C.**

TESIS DOCTORAL

2018

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

**Avances en la determinación de metales basados
en la técnica de análisis en flujo multijeringa e
impresión 3D**

Carlos Mauricio Calderilla Jaime

Directores:

Dra. Luz Olivia Leal Quezada (CIMAV)

Dr. Fernando Maya Alejandro (UIB)

Dr. Víctor Cerdà Martín (UIB)

Doctor por la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears



Centro de Investigación en
Materiales Avanzados S.C.

TESIS DOCTORAL

2018

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

**Avances en la determinación de metales basados
en la técnica de análisis en flujo multijeringa e
impresión 3D**

Carlos Mauricio Calderilla Jaime

Directores:

Dra. Luz Olivia Leal Quezada (CIMAV)

Dr. Fernando Maya Alejandro (UIB)

Dr. Víctor Cerdà Martín (UIB)

**Doctor por el Centro de Investigación en
Materiales Avanzados S.C.**



Universitat
de les Illes Balears



Centro de Investigación en
Materiales Avanzados S.C.

La tesis “Avances en la determinación de metales basados en la técnica de análisis en flujo multijeringa e impresión 3D” se llevó a cabo en el marco del convenio de doble titulación firmado entre la Universidad de las Islas Baleares (UIB), España, y el Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. (CIMAV), México.

El doctorando Carlos Mauricio Calderilla Jaime realizó los trabajos de investigación en el Grupo de Química Analítica, Automatización y Medioambiente, del Departamento de Química de la UIB, y en el Laboratorio de Automatización de Técnicas Analíticas del Departamento de Medioambiente y Energía del CIMAV.

La tesis obtenida del trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Víctor Cerdà y el Dr. Fernando Maya por parte de la UIB, así como la Dra. Luz Olivia Leal Quezada por parte del CIMAV.

En Palma de Mallorca, 8 de Noviembre del 2018

Fdo. Dra. Luz Olivia Leal Quezada

Fdo. Fernando Maya Alejandro

Fdo. Víctor Cerdà Martín

Agradecimientos

En esta sección quiero agradecer a las instituciones, organizaciones o personas que fomentaron con su apoyo la realización de esta tesis. En primera instancia agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca nacional para realizar el doctorado en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), y también que me otorgara la beca mixta para la estancia de investigación en la Universidad de las Islas Baleares (UIB, España).

Se agradece al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) de España y al Fondo Europeo para el desarrollo regional (FEDER) por el soporte financiero a través del proyecto CTQ2016-47461-R.

Por otro lado, agradecer al Laboratorio de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente por permitirme realizar mi estancia de investigación y realizar mis actividades del doctorado, como parte del convenio de doble titulación. Así mismo, agradecer a la Universidad de las Islas Baleares (UIB) por todas las ayudas que se me otorgaron, a través de sus programas de apoyo para la internacionalización y doble titulación.

También quiero agradecer al CIMAV por el apoyo económico que se me ha otorgado, así como permitirme realizar mis estudios de doctorado dentro del centro, haciendo énfasis de agradecimiento al personal, el cual me ha ayudado en diferentes instancias.

Con gran respeto y admiración, quiero agradecer a mis directores de tesis, Dr. Fernando Maya, Dra. Luz Leal y Dr. Víctor Cerdà por dirigirme, aconsejarme y contribuir en la transferencia de conocimiento hacia mi persona durante la realización de este trabajo de investigación, sin dejar a un lado la paciencia y el apoyo que he recibido de su parte en los diferentes obstáculos que se han presentado.

De igual manera quiero agradecer a cada uno de los miembros y ex miembros del grupo de investigación, ya sea del CIMAV o de la UIB, que me han apoyado y orientado, de manera personal y profesional. En especial, quiero agradecer a Jessica Avivar por el apoyo brindado en el primer trabajo de esta tesis.

Finalmente en el área personal, quiero agradecer a cada uno de los integrantes de mi familia por el apoyo y comprensión que he recibido de su parte desde el inicio, sin dejar a un lado a mis amigos que han estado aportando su apoyo hacia mis actividades de formación y orientándome en la parte personal.

Abreviaturas

AAS	Espectrometría de absorción atómica
AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica
Anion-SR	Disco de intercambio aniónico
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CF	Espumas de carbono
CRM	Material de referencia certificado
DAD	Detector de matriz de diodos
DLL	Biblioteca de enlace dinámico
DLP	Procesamiento digital de la luz
DPC	1,5 difenilcarbazida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF	Factor de enriquecimiento
EPA	Agencia de protección al ambiente
ET-AAS	Espectrometría de absorción atómica electrotérmica
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
FIA	Análisis por inyección en flujo
FDM	Modelado por deposición fundida
FLD	Detector de fluorescencia
FT-IR	Espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier
GAC	Química analítica verde
GC-MS/FID	Cromatografía de gases con espectrometría de masas/detector de ionización de llama
GFAAS	Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente
LED	Diodo de emisión de luz
LDH	Hidróxido de doble capa
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
LOP	Lab on paper
LOV	Lab on valve

LWCC	Celda de flujo de largo paso óptico
MCFIA	Análisis por inyección en flujo multiconmutado
MIL	Materiales del Instituto Lavoisier
MIP	Polímero molecularmente impreso
MMR	Robot magnético mecanizado
MOF	Compuesto organometálico poroso
MPFS	Sistema en flujo multibomba
MSPE	Extracción en fase sólida magnética
MSFIA	Análisis por inyección en flujo multijeringa
MTB	Azul de metiltimol
OMS	Organización mundial de la salud
PDMDPS	Copolímero de poli(dimetildifenilsilaxano)
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
PVP	Polivinilpirrolidona
RDSE	Técnica de extracción con disco rotatorio
RSD	Desviación estándar relativa
SBD-RPS	Disco poli(estireno-divinilbenceno) sulfonado
SBD-XC	Disco poli(estireno-divinilbenceno)
SBSE	Técnica de extracción con barra de agitación
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SFA	Análisis en flujo segmentado
SIA	Análisis por inyección secuencial
SIC	Cromatografía por inyección secuencial
SLA	Estereolitografía
SLS	Sinterizado selectivo por láser
SPE	Extracción en fase sólida
SSE	Extracción con adsorbente agitado
Uio	Universitetet i Oslo, Universidad de Oslo
UV	Detector ultravioleta
UV-Vis	Detección espectrofotométrica
ZIF	Estructura de zeolita tipo imidazol

Índice general

Índice de figuras	VI
Índice de tablas	IX
Resumen	1
Resum	2
Abstract	3
CAPÍTULO 1	
Introducción	5
1.1 Generalidades de los metales en el medio ambiente.....	6
1.2 Distribución en el medio ambiente	7
1.3 Fuentes, exposición y toxicidad	9
1.4 Regulación de niveles permisibles.....	13
CAPÍTULO 2	
Metodologías analíticas para la determinación de metales	17
2.1 Técnicas de detección para metales	18
2.1.1 Espectrofotometría UV-VIS	19
2.1.2 Celda de flujo de largo paso óptico.....	20
2.1.3 ICP-OES.....	21
2.2 Técnicas de análisis en flujo	22
2.2.1 MSFIA	23
2.3 Métodos de preconcentración.....	25
2.3.1 Extracción en fase sólida.....	25
2.3.2 Extracción basada en disco.....	27
2.3.3 Extracción con disco rotatorio.....	28
2.4 Técnicas de impresión 3D aplicadas a química analítica.....	28
2.4.1 Estereolitografía.....	29
CAPÍTULO 3	
Objetivos	31
3.1 Hipótesis	32
3.2 Objetivo general	32

3.3 Objetivos específicos	32
---------------------------------	----

CAPÍTULO 4

Desarrollo experimental	35
4.1 Metodología	36
4.2 Métodos químicos.....	37
4.2.1 Determinación de bismuto.....	37
4.2.2 Determinación, especiación y preconcentración de hierro	39
4.2.3 Determinación y preconcentración de cromo (VI).....	40
4.2.4 Determinación y preconcentración multielemental basada en disco.....	41
4.3 Instrumentación y programas informáticos	41
4.4 Metodologías de optimización.....	43
4.5 Dispositivos impresos 3D.....	44
4.6 Foto-inmovilización de disco adsorbente.....	45

CAPÍTULO 5

Método espectrofotométrico automatizado para la determinación de bismuto utilizando una celda de flujo de largo paso óptico	47
5.1 Resumen.....	48
5.2 Experimental	49
5.2.1 Reactivos	49
5.2.2 Muestras	49
5.2.3 Manifold y software	50
5.2.4 Procedimiento analítico.....	51
5.2.5 Optimización de condiciones experimentales.....	52
5.3 Resultados y discusión	53
5.3.1 Condiciones químicas iniciales.....	53
5.3.2 Optimización del método propuesto	54
5.3.3 Parámetros analíticos.....	57
5.3.4 Interferencias	59
5.3.5 Validación y aplicación del método propuesto.....	60
5.4 Conclusiones	61

CAPÍTULO 6

Método automatizado basado en la aplicación de un dispositivo impreso 3D para la extracción, especiación y determinación de hierro (III)..... 63

6.1 Resumen.....	64
6.2 Experimental	65
6.2.1 Reactivos	65
6.2.2 Diseño del dispositivo impreso 3D	65
6.2.3 Manifold e instrumentos	68
6.2.4 Procedimiento analítico.....	69
6.3 Resultados y discusión.....	70
6.3.1 Configuraciones del dispositivo impreso 3D.....	70
6.3.2 Composición del dispositivo impreso 3D	72
6.3.3 Optimización de variables de la especiación y preconcentración de Fe	74
6.3.4 Parámetros analíticos	76
6.3.5 Interferencias	78
6.3.6 Validación y aplicación del método propuesto.....	79
6.4 Conclusiones	81

CAPÍTULO 7

Preconcentración de cromo (VI) utilizando un dispositivo impreso 3D para su evaluación con el uso de disolventes orgánicos 82

7.1 Resumen.....	83
7.2 Experimental	84
7.2.1 Reactivos	84
7.2.2 Manifold e instrumentación.....	85
7.2.3 Procedimiento analítico.....	86
7.2.4 Diseño del dispositivo impreso 3D	86
7.2.5 Evaluación de compatibilidad del dispositivo impreso 3D con disolventes orgánicos .	88
7.3 Resultados y discusión.....	88
7.3.1 Condiciones iniciales de preconcentración	88
7.3.2 Optimización de condiciones experimentales	90
7.3.3 Parámetros analíticos	94
7.3.4 Interferencias	95
7.3.5 Validación y aplicación del método propuesto.....	96
7.4 Conclusiones	98

CAPÍTULO 8

Foto-inmovilización de disco adsorbente para la preconcentración multielemental con detección ICP-OES..... 99

8.1 Resumen.....	100
8.2 Experimental	101
8.2.1 Reactivos	101
8.2.2 Instrumentos	101
8.2.3 Fabricación y diseño de dispositivos rotatorios impresos 3D.....	102
8.2.4 Procedimiento analítico.....	104
8.3 Resultados y discusión.....	104
8.3.1 Aplicaciones y diseños de RDSE.....	104
8.3.2 Selección de las variables de la extracción.....	109
8.3.3 Parámetros analíticos.....	112
8.3.3 Análisis de muestras.....	115
8.4 Conclusiones	118

CAPÍTULO 9

Tendencias actuales de la extracción en fase sólida automatizada en flujo 119

9.1 Resumen.....	120
9.2 Impresión 3D.....	121
9.3 Adsorbentes magnéticos.....	126
9.4 Extracción con adsorbente agitado	129
9.5 Extracción con membranas y discos	130
9.6 Extracción monolítica	132
9.7 Conclusiones y perspectivas.....	135

CAPÍTULO 10

Conclusiones 139

10.1 Conclusiones generales	140
-----------------------------------	-----

CAPÍTULO 11

Referencias 143

11.1 Referencias.....	144
-----------------------	-----

Anexos	163
Anexo 1	164
Publicaciones y participaciones en congresos.....	164

Índice de figuras

Figura 1. Funcionamiento de la celda de núcleo líquido (LWCC).....	21
Figura 2. ICP-OES Perkin Elmer Optima 5300	22
Figura 3. Módulo multijeringa (Técnica MSFIA).....	24
Figura 4. Válvula solenoide externa de tres vías (a) y plataforma protectora de válvulas (b)	24
Figura 5. Esquema general del proceso de extracción en fase sólida	26
Figura 6. Esquema general de la técnica de extracción con disco rotatorio	28
Figura 7. Impresora 3D basada en la técnica SLA (Form 2, Formlabs)	30
Figura 8. Etapas del desarrollo experimental para la obtención de las metodologías analíticas ...	36
Figura 9. Complejo Bi (III)- MTB utilizado para la determinación espectrofotométrica de bismuto con el sistema MSFIA-LWCC.....	38
Figura 10. Esquema del MSFIA-LWCC para la determinación de bismuto	50
Figura 11. Diagrama de Pareto del screening 2^5 para 5 variables analizando la proporción entre la respuesta analítica muestra/blanco (ratio).....	54
Figura 12. Función de deseabilidad para el método de screening, analizando la señal del blanco, el complejo Bi (III)-MTB y el ratio.....	55
Figura 13. Función de deseabilidad para el análisis de la señal del blanco, el complejo Bi (III)-MTB y el ratio resultado del diseño central compuesto	56
Figura 14. Representación del dispositivo impreso 3D para SPE.....	66
Figura 15. Configuración MSFIA con un dispositivo SPE impreso 3D, utilizando un disco adsorbente para la preconcentración y determinación de Fe.....	68
Figura 16. Configuraciones evaluadas para el dispositivo impreso 3D para la determinación de Fe	71
Figura 17. Comparación entre 5 diferentes configuraciones con dispositivos impresos 3D para la determinación de Fe	72
Figura 18. Espectro infrarrojo del material impreso 3D a través de FT-IR	73

Figura 19. Optimización del caudal de preconcentración y elución	75
Figura 20. Optimización de la concentración del reactivo complejante y eluyente	75
Figura 21. Optimización del volumen de eluyente	76
Figura 22. Durabilidad del disco para la determinación de Fe total de 100 inyecciones consecutivas.....	78
Figura 23. Representación esquemática del sistema desarrollado para la preconcentración y determinación de Cr (VI).....	85
Figura 24. Partes y dimensiones del dispositivo impreso 3D para SPE basada en disco	87
Figura 25. Estudios preliminares, selección del tipo de disco y eluyente para la determinación de Cr (VI).....	89
Figura 26. Estudio univariante de las variables del método propuesto	91
Figura 27. Diagrama de Pareto del screening 2 ⁵ , analizando la absorbancia neta para la determinación de Cr (VI).....	92
Figura 28. Función de deseabilidad para la matriz de Doehlert. Nivel de confianza de 95% (p=0.05).....	93
Figura 29. Esquema del procedimiento para fabricar los dispositivos RDSE impresos 3D	103
Figura 30. Dimensiones y diseño de dispositivos impresos 3D para RDSE.....	106
Figura 31. Evaluación del efecto de la geometría de los dispositivos en RDSE.....	108
Figura 32. Optimización del tiempo de extracción para los 14 elementos analizados por el método propuesto.....	110
Figura 33. Efecto de las variables que influyen en la señal analítica para la preconcentración multielemental	111
Figura 34. Efecto del volumen de muestra utilizando el método propuesto.....	114
Figura 35. Línea de tiempo de los desarrollos recientes en la SPE automatizada	120
Figura 36. Dispositivos SPE impresos 3D acoplados a técnicas de análisis en flujo.....	123
Figura 37. Dispositivo impreso 3D aplicado al sistema FIA-LOP.....	124

Figura 38. Pretratamientos automáticos utilizando partículas magnéticas. a) Configuración SIA-MSPE..... 127

Figura 39. Sistemas en flujo basados en membranas no convencionales 131

Figura 40. Monolitos sintetizados recientemente que se han aplicado en sistemas automatizados 133

Índice de tablas

Tabla 1. Límites máximos permisibles de metales en muestras de agua potable.....	14
Tabla 2. Límites máximos permisibles de metales en muestras de agua superficial.....	15
Tabla 3. Límites máximos permisibles de metales en muestras de suelo.....	15
Tabla 4. Procedimiento analítico del sistema MSFIA-LWCC para la determinación de Bi	52
Tabla 5. Rangos experimentales y valores óptimos para el método propuesto.....	53
Tabla 6. Parámetros analíticos para el sistema MSFIA- LWCC.....	57
Tabla 7. Comparación del método propuesto con trabajos previos para la determinación de bismuto con detección espectrofotométrica.....	58
Tabla 8. Evaluación de interferentes en la determinación de bismuto	59
Tabla 9. Validación del método propuesto analizando muestras farmacéuticas y la comparación con los resultados del ICP-OES.....	60
Tabla 10. Análisis de agua de pozo con el método propuesto	61
Tabla 11. Resumen del procedimiento analítico para la especiación y determinación de Fe por el método propuesto.....	70
Tabla 12. Parámetros analíticos para la especiación, extracción y determinación de Fe a través del método propuesto.....	77
Tabla 13. Validación y aplicación del método propuesto analizando muestras de agua	80
Tabla 14. Método de adición-recuperación para la muestra de agua de pozo 1.....	80
Tabla 15. Procedimiento analítico para la preconcentración y determinación de Cr (VI) a través del método desarrollado	86
Tabla 16. Parámetros analíticos del método optimizado para la preconcentración y determinación de Cr (VI)	94
Tabla 17. Aplicación del método desarrollado para la determinación de Cr (VI).....	97

Tabla 18. Análisis de muestras de agua de pozo por el método propuesto usando un volumen de muestra de 8 mL.....	97
Tabla 19. Condiciones de operación del ICP-OES Perkin Elmer Optima 5300	102
Tabla 20. Parámetros para la impresión 3D de dispositivos RDSE.....	107
Tabla 21. Selección de las líneas de emisión ICP-OES para la detección de los metales	109
Tabla 22. Características analíticas obtenidas mediante la técnica de disco inmovilizado RDSE para la determinación de 14 metales.....	113
Tabla 23. Características analíticas para la extracción de metales antes y después de la extracción mediante la técnica RDSE	114
Tabla 24. Validación del método propuesto basado en RDSE con dispositivo impreso 3D analizando materiales de referencia certificados	116
Tabla 25. Análisis de muestras de agua utilizando el dispositivo RDSE impreso 3D.....	117
Tabla 26. Aplicaciones de SPE automatizada utilizando dispositivos impresos 3D acoplados con técnicas de análisis en flujo.....	125
Tabla 27. Métodos automáticos con materiales recientemente desarrollados (membranas, materiales magnéticos o monolitos) o utilizando adsorbentes agitados	134
Tabla 28. Ventajas y limitaciones de las metodologías recientes de SPE automatizada utilizando técnicas en flujo.....	137

Resumen

Esta tesis se centra en el desarrollo de técnicas analíticas para la determinación de metales utilizando nuevas tendencias tecnológicas que aporten una mejora en sus características analíticas, así como en la innovación de la investigación en química analítica. Para ello, se desarrollan 4 diferentes métodos analíticos basados principalmente en técnicas de análisis en flujo, impresión 3D y/o nuevos recursos ópticos, como la celda de flujo de largo paso óptico (LWCC), y se complementa con una revisión bibliográfica sobre la extracción en fase sólida automatizada para visualizar el aporte de los métodos desarrollados en este ámbito.

La aplicación de estos métodos analíticos fue la determinación de metales en muestras ambientales, debido a la importancia actual del monitoreo y control de éstos en el medio ambiente, provocado por el aumento de la exposición del ser humano a estos contaminantes. Además, se busca contribuir con metodologías simples, miniaturizadas y/o que se puedan utilizar en análisis “in situ”.

En una primera instancia, se desarrolla un método para la determinación de bismuto en muestras de agua utilizando una celda de flujo de largo paso óptico con detección espectrofotométrica, optimizando las variables a través del análisis multivariante para mejorar las características analíticas, como el límite de detección y la sensibilidad del método químico utilizado (formación del complejo Bi (III)- azul de metiltimol).

La evaluación de dispositivos impresos 3D para la extracción en fase sólida basada en disco se llevó a cabo en el análisis de muestras de agua para la determinación de Fe y Cr (VI), con el propósito de mejorar el rendimiento de las reacciones, utilizando estructuras basadas en cubos interconectados e incorporando un nuevo diseño de soporte para disco a base de un cono truncado. Así mismo, se realizó la evaluación de la compatibilidad de estos dispositivos con el uso de disolventes orgánicos usados como eluyentes para el proceso de desorción.

El desarrollo de dispositivos giratorios con disco foto-inmovilizado utilizando una resina fotoactiva para la determinación y preconcentración multielemental en muestras con matrices complejas demuestra la versatilidad de los diseños fabricados con impresión 3D. Para lo anterior, se hace una revisión bibliográfica del estado del arte de la extracción en fase sólida automatizada haciendo énfasis en el aporte de la impresión 3D en el pretratamiento de muestras.

Resum

Aquesta tesi es centra en la determinació de metalls utilitzant noves tendències tecnològiques que proveeixin millorament en les seves característiques analítiques, així com la innovació en la recerca en química analítica. Per a això, es desenvolupen 4 diferents mètodes analítics basats principalment en tècniques d'anàlisi en flux, impressió 3D i / o nous recursos òptics, com la cel·la de flux de llarg pas òptic (LWCC), i es complementa amb una revisió bibliogràfica sobre l'extracció en fase sòlida automatitzada per a visualitzar l'aportació dels mètodes desenvolupats en aquest àmbit.

L'aplicació principal d'aquests mètodes va ser la determinació de metalls en mostres ambientals, a causa de la importància actual del monitoratge i control de metalls en el medi ambient provocat per l'augment d'exposició d'aquests contaminants a l'ésser humà. A més, es busca contribuir amb metodologies simples, miniaturitzades o que es puguin portar i utilitzar en anàlisi "in situ".

En una primer instància, es desenvolupa un mètode per a la determinació de bismut en mostres d'aigua utilitzant una cel·la de flux de llarg pas òptic amb detecció espectrofotomètrica i optimitzat a través d'anàlisi multivariant per millorar les característiques analítiques, com el límit de detecció i la sensibilitat del mètode químic emprat (formació del complex Bi (III) - blau de metiltimol).

L'avaluació de dispositius impresos 3D per a l'extracció en fase sòlida basada en disc es va dur a terme en l'anàlisi de mostres d'aigua per a la determinació de Fe i Cr (VI), amb el propòsit de millorar el rendiment de les reaccions utilitzant estructures basades en cubs interconnectats i incorporant un nou disseny de suport per disc a base d'un con truncat. Així mateix, es va realitzar l'avaluació de la compatibilitat d'aquests dispositius amb l'ús de dissolvents orgànics, usats com eluents per al procés de desorció.

El desenvolupament de dispositius giratoris amb disc foto-immobilitzat emprant una resina fotoactiva per a la determinació i preconcentració multielemental en mostres amb matrius complexes demostra la versatilitat dels dissenys fabricats amb impressió 3D. Per l'anterior, es fa una revisió bibliogràfica de l'estat de l'art de l'extracció en fase sòlida automatitzada fent èmfasi en l'aportació de la impressió 3D en el pretractament de mostres.

Abstract

This thesis focuses on advances in the determination of metals using new technological trends that provide improvement in their analytical features, as well as innovation in research of analytical chemistry. For this, 4 different analytical methods have been developed, based mainly on flow analysis techniques, 3D printing and / or new optical resources, such as the long-path waveguide flow cell (LWCC, liquid waveguide capillary cell). It is complemented by a bibliographic review on automated solid-phase extraction to visualize the contribution of the methods developed in this field.

The main application of these methods was the determination of metals in environmental samples, due to the current importance of the monitoring and control of metals in the environment, caused by the increased exposure of humans to these contaminants. In addition, it seeks to contribute with simple and miniaturized methodologies, which could be potentially used for "in situ" analysis.

In first instance, a method for the determination of bismuth in water samples was developed using a LWCC with spectrophotometric detection, optimizing the variables through multivariate analysis to improve the analytical features, such as the limit of detection and sensitivity of the chemical method used (formation of the Bi (III) complex - methylthymol blue).

The evaluation of 3D printed devices for disk-based solid-phase extraction was carried out in the analysis of water samples for the determination of Fe and Cr (VI), with the purpose of improving the performance of the reactions using structures based in interconnected cubes and incorporating a new disk support design based on a truncated cone. Likewise, the evaluation of the compatibility of these devices with the use of organic solvents, used as eluents for the desorption process, was carried out.

The development of rotating devices with photo-immobilized sorbent disk using a photoactive resin for the determination and multielemental preconcentration in samples with complex matrices demonstrates the versatility of the designs manufactured with 3D printing. Therefore, a bibliographic review of the state of the art of automated solid-phase extraction has been carried out, emphasizing the contribution of 3D printing sample pretreatment.

CAPÍTULO 1

Introducción

En este capítulo se presentan aspectos generales de los metales, sus aplicaciones, usos, normatividad y toxicidad, entre otros, con el propósito de tener una visión amplia sobre los criterios para elegir los analitos de interés en esta investigación.

1.1 Generalidades de los metales en el medio ambiente

El crecimiento exponencial del uso de los metales ha generado un incremento en su exposición, produciendo además un gran impacto en el medio ambiente causado por su nivel de toxicidad incluso a bajas concentraciones [1]. Todos los componentes del ecosistema se ven afectados por la alteración de los ciclos geoquímicos de los metales, provocando un desequilibrio y un desplazamiento de los mismos dentro del ecosistema. También son considerados como contaminantes debido a la deficiente capacidad de biodegradación de manera natural [2].

El fenómeno de deposición que se genera a través del tiempo, conjuntamente con el aumento de emisiones, permite el enriquecimiento de los metales en la superficie terrestre, por lo tanto, en un área cercana a las zonas urbanas se incrementa la posibilidad de exposición de la población a los metales, causada principalmente por las fuentes antropogénicas. El término metal potencialmente tóxico es utilizado para aquellos elementos metálicos o metaloides que están asociados tanto a su esencialidad (oligoelementos) como a su toxicidad y efectos negativos al ecosistema [3]. El estudio de concentraciones de elementos con cierto grado de esencialidad (Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Mo, Se y Zn) en procesos bioquímicos es un aspecto de relevancia actual debido a su posible participación en la carcinogénesis, tomando en cuenta que a concentraciones altas estos elementos pueden producir un efecto negativo, pero a concentraciones inferiores del valor óptimo afecta el funcionamiento del organismo [4]. En cambio, los metales pesados como Pb, Hg y Cd han sido ampliamente estudiados debido a su alta toxicidad incluso a concentraciones bajas [5].

Debido a los efectos adversos de los contaminantes en el ser humano, animales y otros componentes del ecosistema, los organismos reguladores y las autoridades correspondientes, llevan a cabo el control, la evaluación y el monitoreo de estos contaminantes en el medio ambiente, así como en alimentos o matrices clínicas [6].

Los controles de calidad, control de contaminación y/o monitoreo de procesos ambientales implican un gran número de muestras, las cuales requieren analizarse en un periodo corto de tiempo con una adecuada precisión, por lo que es necesario desarrollar e implementar nuevos métodos analíticos con alta sensibilidad y robustez que permitan al usuario determinar los analitos de interés de manera rápida y simple.

1.2 Distribución en el medio ambiente

La presencia de metales en muestras ambientales tiene un origen natural y/o antropogénico que dependerá del tipo y procedencia de la muestra. Las principales fuentes naturales de metales son las rocas y suelos minerales, también se considera interesante la aportación de los procesos geoquímicos naturales hacia medios terrestres y acuáticos, debido a su interrelación, y a que el comportamiento está regulado por el deterioro de la intemperie y procesos de erosión [7]. Los minerales a base de metales son las principales fuentes naturales de Cu, Zn, Cd y Pb, que se encuentran principalmente asociados al azufre en forma de sulfuros. Sobre la superficie, los sulfuros se pueden oxidar fácilmente ocasionando que algunos elementos se liberen con la meteorización ambiental. El Cu, Zn y Cd tienden a concentrarse en óxidos de Mn, mientras que el Pb se asocia a óxidos e hidróxidos de Fe [8].

La presencia de metales en los suelos puede variar de acuerdo al tipo de suelo o mineral. En el caso del cobre, se puede encontrar principalmente como compuestos de sulfuro (calcocita-Cu₂S, covelita-CuS), mientras que el Fe se encuentra en el suelo principalmente como óxidos (hematita-Fe₂O₃, goetita-FeOOH, magnetita-Fe₃O₄). El Mn se puede encontrar en diversos minerales como rodocrosita (MnCO₃), pirolusita (MnO₂), hausmanita (Mn₃O₄), manganita (MnOOH). Las formas de minerales de Ni y Co en el suelo son menos abundantes pero de estructura compleja [9]. En el caso de bismuto, se puede encontrar como bismutita ((BiO)₂CO₃) o sulfuro de bismuto (Bi₂S₃), y el plomo se encuentra principalmente en forma de galena (PbS) o cerusita (PbCO₃) [10]. Los elementos Cd y Cr se encuentran asociados principalmente a otros metales [11,12].

El ciclo biogeoquímico de metales y metaloides se ha acelerado por las actividades humanas. Se han encontrado altas concentraciones de metales en diferentes componentes de la biosfera, y su posible movilización en condiciones ambientales provoca una modificación en la función del ecosistema. El desequilibrio de los ciclos, específicamente respecto al suelo, es provocado principalmente por el uso de fertilizantes, abonos orgánicos, desechos industriales y municipales e irrigación, así como de depósitos húmedos y / o secos [13].

La distribución de metales en los sistemas acuáticos (agua subterránea, superficial, océanos o mares) depende de las condiciones físico-químicas del medio, así como de la forma en que se encuentra, es decir, en partículas en suspensión o en disolución [7]. El tamaño de partícula en las capas sedimentarias tiene una gran influencia en los

contaminantes metálicos, ya que influye en su distribución y destino final a través de medios porosos. Las partículas finas tienen una gran relación superficie/volumen, por lo tanto pueden adsorber mayor cantidad de metales y dependiendo de su composición puede retener los metales a través de enlaces iónicos [14]. Un aspecto relevante sobre los flujos en medios acuosos es que las partículas finas presentan una mayor dispersión en comparación con las partículas gruesas, por consecuencia se tiene una mayor área superficial efectiva para su interacción con los metales disueltos. Como resultado de estos factores, los materiales suspendidos contienen la mayor fracción de metales de fuentes no antropogénicas, en la mayoría de los sistemas acuáticos, incluidos ríos, estuarios y agua de mar [15]. Las principales fuentes naturales de movilidad de metales hacia el agua son las rocas y el suelo, añadiendo las fuentes antropogénicas, como vertidos de contaminantes, uso de fertilizantes y productos químicos usados en la agricultura, generación de residuos sin tratamiento, entre otros [16]. Para visualizar la distribución de los metales en las muestras acuosas, en química analítica se establecen 4 formas de presencia, metales disueltos, metal, metal total y metal en sólidos en suspensión. El metal disuelto es aquel que está presente en una muestra filtrada a través de una membrana de 0.45 μm . El metal se refiere a que estando disuelto, una parte no controlada del mismo está acumulado en los sólidos en suspensión, y se re-disuelve al acidificar la muestra. El metal total es determinado sobre una muestra no filtrada tras un proceso de digestión, o la suma de las concentraciones del metal disuelto y de su forma particulada. Finalmente, los metales en suspensión son aquellos presentes en una muestra de agua que queda retenida en un filtro de membrana de 0.45 μm [17].

Otro componente importante de la distribución de los metales son las emisiones que se generan hacia la atmósfera, siendo las partículas que provienen de la minería las consideradas de mayor riesgo para el medio ambiente y la salud humana. El transporte de metales en agua, suelo y biota tiene el mayor potencial para transportar contaminantes no volátiles a escala global, debido a que las masas de aire no están limitadas por barreras topográficas o de otro tipo. Estas masas se mueven a una mayor velocidad en comparación con el agua subterránea, superficial o vectores biológicos [18]. Las principales fuentes son las partículas que provienen del suelo, pero respecto a las fuentes antropogénicas se puede mencionar las centrales eléctricas, el uso de calderas cuyo funcionamiento requiere combustibles fósiles para aplicación industrial, comercial o residencial, producción de aceros, producción de cemento, incineración de residuos,

combustión de gasolina u otros combustibles o la minería, mencionada anteriormente [19].

El análisis del tiempo de permanencia de un metal cerca de la fuente, cantidad de translocación a mayores distancias y cuánto se transporta en disolución a través de los suministros de agua superficial y subterránea, es una problemática que puede ser solucionada con el monitoreo de los metales, donde la química analítica juega un papel importante para el análisis de muestras ambientales, desarrollando y aplicando nuevas metodologías analíticas.

1.3 Fuentes, exposición y toxicidad

En esta sección se describen individualmente los analitos estudiados, excepto los metales alcalinotérreos que se revisan de manera conjunta. Se resumen los aspectos generales de fuentes naturales y antropogénicas, exposición y toxicidad de cada uno de los metales, remarcando su relevancia:

- Bismuto (Bi).- Algunos autores consideran que este elemento en concentraciones bajas tiene una función biológica, pero de acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), no es un elemento esencial [20]. El aumento del uso de Bi en sustitución del Pb en procesos de manufactura, ha generado una problemática a los organismos vivos por su exposición al mismo. Las fuentes antropogénicas son la incineración de basura, fabricación de aleaciones y minería de plomo, estaño, cobre y zinc. Como fuentes naturales se pueden mencionar principalmente las erupciones volcánicas [15,16]. Respecto a las consecuencias de la exposición a este analito, cabe señalar que puede bioacumularse en células epiteliales, provocando alteraciones en el citoplasma. También se puede asociar a afectaciones en el sistema óseo, articulaciones, sistema nervioso y riñones [23].
- Cadmio (Cd).- Es un contaminante ambiental caracterizado por su toxicidad en diferentes órganos del cuerpo humano, y se considera que no tiene una función biológica. Dependiendo de su exposición y biodisponibilidad, la concentración de Cd puede aumentar con la edad [24]. Si la exposición es por ingesta, el cadmio se absorbe y se transporta a través de la sangre. Este elemento es bioacumulado en el hígado y riñón (absorción del 50-75%), principalmente por la ingesta de

alimentos contaminados y bebidas alcohólicas. En cambio, si su exposición es por vía respiratoria, se absorbe entre un 40-60%, se acumula en los pulmones, y su principal causa es el humo del tabaco [25]. Las principales fuentes naturales del Cd son los minerales de zinc. Entre las fuentes antropogénicas se pueden mencionar las fundidoras de zinc, la industria del acero, incineradoras y centrales eléctricas [11].

- Cromo (Cr).- Es el séptimo elemento más abundante en la tierra, por lo tanto se hace evidente su alta movilidad en el agua, en el aire como polvo fino y su deposición en el suelo [12]. El Cr es un micronutriente esencial en su estado de oxidación (III), se requiere para el metabolismo de grasas, lípidos y proteínas. Por otro lado, en el estado de oxidación (VI) es un agente oxidante tóxico a partir de 0.05 mg L^{-1} [26]. La ingesta e inhalación de compuestos con Cr (VI) pueden producir irritación en la nariz, pulmones, estómago e intestino, pero también se asocia como agente cancerígeno. Las principales fuentes de exposición se deben a la inhibición de corrosión, disoluciones de limpieza para cristalería y acabado metálico, en la conservación de madera, curtiduría, en textiles y en la fabricación de pigmentos y colorantes [27].
- Cobalto (Co).- Es el componente principal de la vitamina B12, siendo un elemento esencial para los organismos vivos. En concentraciones menores provoca anemia, afectaciones en el sistema nervioso, boca e hipersensibilidad en la piel [28]. La velocidad de absorción de este elemento depende de su concentración, es decir, en concentraciones altas puede generar mayor absorción en los tejidos, provocando inhibiciones de enzimas, cambios en los procesos metabólicos, sustitución del Zn y daños en riñones e hígado [29,30]. Respecto a la exposición, se puede mencionar como principal vía la ingestión, principalmente de alimentos contaminados o el contacto con suelo y/o agua cercanos a industrias de producción de catalizadores, pigmentos o minería. El Co también se utiliza en la producción de vidrio, cerámica y sustancias para secado de pinturas y barnices [31].
- Cobre (Cu).- Este elemento es vital para los seres vivos, pero tiene un rango biológico muy corto, para pasar de esencial a tóxico, por ello se monitorea en diferentes muestras. En el ámbito de la geoquímica es un elemento importante debido a su movilidad, provocada por su fácil liberación y sus compuestos

altamente solubles en agua [32]. El Cu es un componente para las enzimas que participan en el metabolismo, normalmente se une a las proteínas. El Cu puede liberarse para catalizar la formación de radicales hidroxilo. Por otro lado, a altas concentraciones de Cu y/o el incremento de exposición, provoca daño oxidativo y afectaciones degenerativas [33]. La producción de cobre crece rápidamente debido a una gran variedad de aplicaciones, pero sus principales fuentes son la minería, fundición, industrias de galvanizado, acero, refineras, incineración de residuos, fertilizantes y aplicación de herbicidas o fungicidas [34].

- Hierro (Fe).- La producción mundial de hierro es más de 500 millones de toneladas al año, siendo el acero una de sus aplicaciones principales [35]. El Fe es un micronutriente esencial para procesos biológicos en los organismos vivos, pero a concentraciones elevadas causa daño en los tejidos y alteraciones en las rutas metabólicas [36]. Además del acero, también se utiliza para el hierro fundido, acero al carbono, forjado, aceros aleados y producción de óxidos de hierro, pero su presencia en el agua y en partículas suspendidas en el aire es debido a la erosión y el contacto con el suelo. Las concentraciones en el medio ambiente varían, pero se pueden encontrar de la siguiente manera: mineral de hierro 20-70%, en el suelo 0.7-4.7%, agua subterráneas 0.5-100 mg L⁻¹, agua potable 0.3 mg L⁻¹ y aguas oceánicas 0.01-0.14 mg kg⁻¹ [35,37].
- Manganeso (Mn).- Es un oligoelemento que se concentra mayoritariamente en los océanos en comparación con la superficie terrestre y la principal vía de exposición es la ingesta de agua [38]. El Mn es un elemento que el cuerpo autorregula, ya que requiere de bajas concentraciones de este metal, por sus funciones de activador de enzimas o como componente de otras. En cambio, a concentraciones mayores puede generar cambios en las estructuras de los ganglios basales o en su defecto provocar astrocitosis (aumento anormal de células del tejido nervioso) [39,40]. Las principales fuentes de Mn en el océano son los sedimentos de plataforma continental, sistemas hidrotermales, escorrentía continental o disoluciones de las partículas eólicas. El contacto con este elemento también puede ser por fuentes de tipo rocoso, quema de combustibles fósiles y aditivos para gasolina, producción de acero, plantas de energía eléctrica, minería, fabricación de herbicidas. La procedencia natural se atribuye a los alimentos [41,42].

- Metales alcalinotérreos.- Dentro de este grupo se encuentran los elementos berilio (Be), magnesio (Mg), calcio (Ca), estroncio (Sr), bario (Ba) y radio (Ra). El primero y el último son altamente tóxicos y no tienen función biológica conocida. El Be ocasiona una enfermedad que ataca principalmente a los pulmones, llamada beriliosis. Existe una baja disponibilidad de Ba, debido a su alta reactividad. En su interacción con el Sr tienen un papel importante en la vida acuática, así como en la medicina [43]. Los elementos Mg y Ca tienen funciones biológicas en los organismos vivos. El magnesio es uno de los elementos más abundantes. Las principales aplicaciones de los metales alcalinotérreos son en la industria de manufactura, en la medicina (placas de berilio, isótopos radiactivos), desarrollo de nuevos materiales, o en estudios ambientales [44].
- Plomo (Pb).- Es un metal pesado no esencial, considerado altamente tóxico, cuyos efectos sobre los organismos son negativos [45]. Las fuentes naturales son la erosión de las rocas, actividad ígnea y decaimiento radiactivo. Por otro lado, las fuentes antropogénicas son la construcción de edificios, baterías plomo-ácido, balas, pesas, soldaduras, aleaciones, incineración de residuos, quema de carbón y la explotación de minas [46]. Respecto a la exposición, las principales vías son la inhalación e ingestión, aunque en pocas ocasiones a través de la piel. La absorción por inhalación es del 40% y por ingestión es entre 10-15%. Después de la absorción se distribuye a través de la sangre hacia los huesos y tejidos blandos. La afectación principal es la sustitución de plomo por calcio en los huesos, provocando alteraciones en su funcionamiento [47].
- Níquel (Ni).- Este elemento es un micronutriente esencial, pero en concentraciones excesivas presenta efectos tóxicos, siendo el tetracarbonilo de níquel, el compuesto más tóxico de este elemento. La principal vía de exposición es a través de alimentos o agua contaminada, la dermatitis es el principal síntoma de exposición. En lo referente a la inhalación, se tiene contacto con el tetracarbonilo de níquel a través del consumo de tabaco. La bioacumulación de Ni se lleva a cabo en el riñón, provocando alteraciones de este órgano y también está asociado a cáncer de pulmón [48]. Las principales fuentes de este elemento son la minería, lodos residuales de plantas de tratamiento de agua, residuos municipales, emisiones de las fundiciones, refinерías, uso de fertilizantes y pesticidas,

producción de acero inoxidable y joyería, erupciones volcánicas, incendios forestales y erosión de suelo [49].

- Titanio (Ti).- El incremento del uso de Ti en los últimos años se debe a sus diversas aplicaciones, como dióxido de titanio en celdas solares, como catalizador de esterilización, en la limpieza del aire y tratamiento de aguas, protectores solares, cremas dentales, cosméticos, así como en la fabricación de aviones, misiles, pinturas, plásticos y materiales de construcción. Su principal fuente natural son las rocas y sedimentos en los minerales [50]. La liberación de iones metálicos en aplicaciones biomédicas de Ti específicamente en aleaciones, ha despertado un interés especial sobre la exposición a este metal, ya que presenta características citotóxicas [51].
- Vanadio (V).- Este elemento también tiene un comportamiento dual, es decir, tiene una función biológica definida, pero en concentraciones mayores a las necesarias puede ocasionar afectaciones al organismo, o bioacumularse. El V se puede encontrar en el medio ambiente debido a su presencia en la quema de combustibles fósiles, pinturas, cerámica, tintas, catalizadores y fabricación de acero [52]. La exposición al V puede ocasionar pérdida de peso corporal, afectación en la reproducción, toxicidad en el desarrollo e incluso la muerte. Los efectos de este elemento dependerán de las condiciones de la dieta y del estado de oxidación presente en la exposición. En relación a la fertilidad, la vía de exposición más estudiada es la vía oral [53].

1.4 Regulación de niveles permisibles

Debido al aumento de la exposición a diferentes contaminantes, las organizaciones o instituciones gubernamentales han desarrollado una serie de normativas con la finalidad de regular la presencia de estos contaminantes en determinadas matrices, como por ejemplo muestras ambientales. Por ello, en esta sección se hace mención de los límites permisibles y recomendaciones para metales establecidos por organismos reconocidos mundialmente, como es el caso de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (EPA), así como locales de México (normas mexicanas) y España. En la Tabla 1 se pueden observar los límites

máximos permisibles de algunos metales considerados en las normativas para agua de consumo humano (agua potable). Se puede observar que las normativas se basan en las recomendaciones emitidas por la OMS [54]. Para el caso de México, se tiene establecida una norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 (Salud ambiental, agua para uso y consumo humano- límites permisibles de calidad y tratamientos a que se debe someter el agua para su potabilización), en la cual se establecen los límites permisibles en agua potable para algunos metales analizados en esta tesis. Cabe destacar que se incluye al bario pero no al níquel, además los límites son semejantes a los propuestos por las OMS, excepto para Pb y Cd, pero están en el mismo orden de magnitud [55]. España a través del Real Decreto 140/2003 regula la calidad del agua para consumo humano, en el cual se establecen los criterios sanitarios que se deben cumplir, incluyendo los parámetros químicos entre los cuales se encuentran los metales [56]. Los límites máximos para España son semejantes a los valores recomendados, incluso algunos de ellos son menores, como por ejemplo para Fe, esto se puede observar en la Tabla 1. La EPA establece como criterios de control para el agua potable, los primeros [57] y segundos estándares [58] para consumo humano, dentro de estos parámetros se contemplan los límites permisibles para metales, estos se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Límites máximos permisibles de metales en muestras de agua potable

Agua potable	Límites máximos permisibles (mg L ⁻¹)								
	Bario (Ba)	Berilio (Be)	Cadmio (Cd)	Cobre (Cu)	Cromo (Cr)	Hierro (Fe)	Manganeso (Mn)	Níquel (Ni)	Plomo (Pb)
OMS [54]	0.7	-	0.003	2	0.05	0.3	-	0.07	0.01
México [55]	0.7	-	0.005	2	0.05	0.3	0.15	-	0.025
España [56]	-	-	0.005	2	0.05	0.2	0.05	0.02	0.01
EUA [57,58]	2	0.004	0.005	1	0.1	0.3	0.05	-	0.015

Los límites máximos permisibles para el agua superficial están regulados de acuerdo al lugar de procedencia (río o lago) o su aplicación, ya sea para agua potable o para uso agrícola. En la Tabla 2 se presentan los rangos entre los cuales se regulan los metales en este tipo de muestras. México regula a través de la NOM 001-SEMARNAT-1996 que establece los límites permisibles de contaminantes de descargas residuales y bienes nacionales [59], Estados Unidos de América a través de sus estándares de agua superficial (Water Quality Standard for Surface Water) [60] y en España usando el Real

decreto 60/2011, que establece las normas de calidad ambiental en ámbito de políticas de agua [61].

Tabla 2. Límites máximos permisibles de metales en muestras de agua superficial

Agua superficial	Límites máximos permisibles (mg L ⁻¹)								
	Bario (Ba)	Berilio (Be)	Cadmio (Cd)	Cobre (Cu)	Cromo (Cr)	Hierro (Fe)	Manganeso (Mn)	Níquel (Ni)	Plomo (Pb)
México [59]	-	-	0.05-0.4	4-6	0.5-1	-	-	2-4	0.2-1
España [61]	-	-	0.001-0.002	0.005-0.12	0.05	-	-	0.02	0.007
EUA [60]	1	0.001	0.009	0.004	0.05	1	0.1	0.008	0.008

Por otro lado, los metales pesados en suelos contaminados representan una problemática actual y su monitoreo en muestras ambientales es relevante. La Tabla 3 presenta los límites permisibles para este tipo de muestras. La norma mexicana NOM 147-SEMARNAT/SSA1-2004 regula y establece las concentraciones de As, Ba, Be, Cd, Cr, Hg, Ni, Ag Pb, Se, Tl y V en suelos contaminados [62]. Los límites establecidos están jerarquizados de acuerdo el tipo de suelo o actividad (agrícola, industrial, residencial o comercial), y los datos presentados son un rango que incluye dichas actividades. Estados Unidos de América tiene un control de metales en suelo mucho más estricto, incluyendo Fe (5.5-82 g kg⁻¹), Sr (4.7-70 g kg⁻¹) y Mn (0.18-2.6 g kg⁻¹) [63]. Mientras tanto, España regula los compuestos orgánicos en suelo de manera general, pero los metales son regulados por los gobiernos de cada comunidad autónoma. Los datos de la Tabla 3 son los límites establecidos por el gobierno de las Islas Baleares en su proyecto de ley aprobado el 10 Julio del 2018 [64].

Tabla 3. Límites máximos permisibles de metales en muestras de suelo

Suelo	Límites máximos permisibles (g kg ⁻¹)								
	Ba	Be	Cd	Co	Cu	Cr	Ni	Pb	V
México	5.4-67	0.15-1.9	37-450	-	-	0.3-0.5	1.6-20	0.4-0.8	0.2-1
España	0.1-3.6	-	0.46-70	0.008-0.2	0.02-1	0.03-0.7	0.02- 0.8	0.02-0.1	-
EUA	1.5-22	0.016-0.23	7.1-98	0.002-0.03	0.3-4.7	0.001-0.006	0.06 -2.2	0.001-0.08	0.04-0.6

Los límites permisibles en las diferentes matrices no tienen una diferencia en magnitud entre los países, pero debido al incremento de la exposición a los metales, ha generado la inclusión de algunos de éstos en las regulaciones, un ejemplo de ello son las regulaciones en muestras de suelo por parte de la EPA. En algunos casos, el límite

máximo permisible está asociado a los límites de detección de los métodos de análisis, por lo cual el desarrollo de nuevas metodologías con menores límites de detección puede representar una aportación hacia la disminución del máximo permitido.

CAPÍTULO 2

Metodologías analíticas para la determinación de metales

En este apartado se revisan las diferentes técnicas analíticas para la determinación de metales, haciendo énfasis en las ventajas de las metodologías utilizadas en el desarrollo de esta investigación.

2.1 Técnicas de detección para metales

Diversas técnicas de detección se han utilizado para la determinación de metales, siendo las más populares las metodologías analíticas atómicas. El análisis puede ser unielemental o multielemental, esto dependerá de la aplicación del análisis. La técnica de espectrometría de absorción atómica (AAS) es simple y es ampliamente utilizada para la determinación de metales, pero su principal limitación es su baja sensibilidad y requiere de pretratamiento de muestra para la cuantificación de metales a concentraciones de $\mu\text{g L}^{-1}$, ocasionado principalmente por las interferencias de matriz [65]. Esta técnica se ha aplicado a una gran variedad de tipos de muestras, tales como muestras ambientales [66], alimentos [67], lubricantes [68] y muestras biológicas [69] para la determinación de diversos metales.

Otra técnica aplicada para la determinación de metales es la espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ET-AAS), su principal desventaja es el deterioro del tubo de grafito o la deposición de residuos de carbono, disminuyendo la sensibilidad del método. Por otro lado, la muestra podría presentar otro tipo de interferencias de matriz debido a su composición, por ello al utilizarla se sugiere acoplar pretratamientos previos para la separación de la matriz [70]. Sin embargo, esta técnica se ha utilizado ampliamente en la determinación de metales a niveles trazas y ultratrazas en diferentes muestras, mejorando el tiempo de análisis, el uso de bajos volúmenes de muestra, en comparación con AAS [71].

La espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) ha sido aplicada ampliamente en la determinación de metales en muestras ambientales y biomédicas, aunque el número de metales que pueden ser cuantificados por esta técnica está limitado. El volumen de muestra requerido es alto y también requiere de modificaciones en sus tratamientos químicos, como su acoplamiento a las técnicas de generación de hidruros o vaporización electrotrémica [72].

Con el desarrollo de la tecnología y el surgimiento del plasma para su aplicación en química analítica en la determinación y especiación de metales, surgen las técnicas ICP-MS (Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente) e ICP-OES (Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente). Las principales desventajas de estas técnicas es que son de alto costo de adquisición y mantenimiento, requieren pretratamiento de muestra y capacitación especializada para su manejo. Por otro

lado, se pueden realizar análisis multielementales en un periodo corto de tiempo, en algunos equipos también se pueden realizar análisis cualitativos, se ha minimizado el volumen de muestra que es inyectado alcanzado límites de detección bajos y alta sensibilidad utilizando mecanismos recientes de inyección de muestras [73].

Además de las técnicas espectrométricas atómicas, las técnicas moleculares también se han aplicado para la determinación de metales en diferentes muestras realizando análisis individuales, o simultáneos utilizando métodos matemáticos [74], como es el caso de la espectrofotometría ultravioleta-visible. Durante el desarrollo de las diferentes metodologías en esta tesis, se han utilizado la detección ICP-OES y espectrofotométrica, debido a las ventajas que presentan en la determinación de metales.

2.1.1 Espectrofotometría UV-VIS

La espectrometría molecular se ha reconvertido en una herramienta útil para la química analítica, debido a las nuevas líneas de desarrollo tecnológico orientadas hacia la instrumentación micro-volumen, ya que se complementa con sus ventajas intrínsecas de simplicidad, flexibilidad y bajo coste; por consecuencia, abre la posibilidad de generar y desarrollar nuevos métodos espectrofotométricos miniaturizados para el monitoreo ambiental.

Esta técnica analítica se basa en la ley de Lambert-Beer (Ecuación 1), que relaciona la absorbancia (A), la absortividad molar (ϵ), la concentración (c) y la longitud del camino óptico (b), este último parámetro está determinado por la longitud de la celda utilizada para colocar la muestra [75]. La ley se cumple con valores de absorbancia menores a 1.5, ya que a partir de este valor el error obtenido en las determinaciones puede ser no asumible.

$$A = \epsilon \times c \times b$$

Ecuación 1

Los avances en el aumento de la longitud del camino óptico, en los detectores de red de diodos y en la electrónica de alta velocidad, ha permitido el progreso en los espectrofotómetros de nueva generación. Se han estado utilizando actualmente los dispositivos de carga acoplada (CCD) o redes de fotodiodos, reemplazando los

fotomultiplicadores clásicos [76]. En lo que respecta a la base y aplicación de la técnica, se han desarrollado accesorios para mejorar las características analíticas utilizando sistemas combinados a base de gotas, fibra óptica de núcleo líquido, microceldas, pipetas transmisivas de luz ultravioleta o sistemas de camino óptico variable [77]. Tomando como referencia la ley de Lambert-Beer, se lograría un valor mayor de la señal analítica generando un camino óptico mayor a través de fibra óptica de núcleo líquido de mayor longitud en comparación con las celdas convencionales. En esta tesis se planteó el uso de la celda de flujo de largo paso óptico (LWCC) acoplada a una detección espectrofotométrica de un complejo metálico, el fundamento y descripción de esta celda se encuentra en la siguiente sección.

2.1.2 Celda de flujo de largo paso óptico

Los principales objetivos del uso de la celda de flujo de largo paso óptico (LWCC) en las metodologías analíticas, son el aumento de la sensibilidad y la disminución de los límites de detección. La LWCC permite la determinación de especies químicas a concentraciones nanomolares, detectando al máximo la señal óptica y minimizando al mismo tiempo el ruido de fondo. El funcionamiento se basa en la reflexión total de la luz introducida en el capilar, debido a que el índice de refracción del tubo capilar (n^1) es menor en relación al índice de refracción del núcleo líquido (n^2 , el líquido contenido en la celda) [78].

Las celdas se pueden clasificar en dos tipos, tomando en cuenta el material de fabricación (tipo I y tipo II). El tipo I se compone de tubos de teflón AF (fluoroplástico amorfo) con bajo índice de refracción. La luz viaja por el capilar y se refleja totalmente en el interior de la interfaz de teflón AF, con la condición de que el ángulo de incidencia supere el ángulo crítico, la luz pasa desde un medio más denso ópticamente (agua) a la interfaz con el medio menos denso (teflón AF). En cambio, la celda tipo II consiste en un tubo capilar de sílice fundida ($n^1 = 1.46$) con un recubrimiento exterior de teflón AF con bajo índice de refracción; este tipo tiene la misma base de funcionamiento que el tipo I [79], pero la diferencia está en que la LWCC de tipo II es impermeable a los gases. En la Figura 1 se presenta un esquema del funcionamiento de la celda de flujo de largo paso óptico.

El capilar puede medir hasta 5 m de longitud, ya que al ser de teflón puede enrollarse, minimizando el espacio requerido. Esta celda se ha aplicado a diferentes

técnicas de detección, incluyendo la espectrofotetría, fluorescencia, quimioluminiscencia y espectrometría Raman; las investigaciones sobre su uso se han centrado en matrices ambientales, debido a las bajas concentraciones de algunos contaminantes [80].

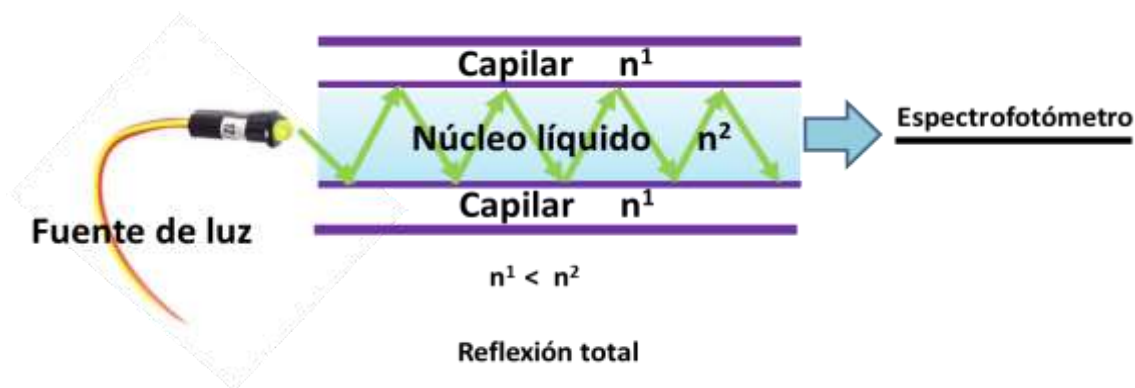


Figura 1. Funcionamiento de la celda de núcleo líquido (LWCC)

2.1.3 ICP-OES

La instrumentación con plasma acoplado inductivamente (ICP) permite análisis rápidos, simultáneos y multielementales, obteniéndose límites de detección bajos, a concentraciones de $\mu\text{g L}^{-1}$ para algunos elementos. Además, se reducen las interferencias de matriz interelementales, se aumenta la reproducibilidad de los resultados y se extiende su aplicación a muestras de gases, líquidos y sólidos. Sin embargo, presenta problemas de interferencias espectrales, ya que la introducción de muestra es ineficiente y se tienen problemas en la detección dependiendo de la naturaleza de la muestra, por ello en ocasiones se requiere de herramientas externas para la introducción de muestra o pretratamientos previos [81].

La espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), se basa en un plasma altamente energético y eléctricamente neutro que está compuesto por iones, electrones y partículas neutras, comúnmente de argón, el cual recibe la energía de un campo electromagnético de alta frecuencia o de una corriente continua, alcanzando una temperatura de hasta $8,000\text{ }^\circ\text{K}$ [82]. En la Figura 2 se muestra el ICP-OES del fabricante Perkin Elmer modelo óptima 5300, utilizado en el desarrollo de esta tesis.

Aunque esta técnica se ha considerado costosa en comparación con otras técnicas, y con las limitaciones antes mencionadas, los desarrollos tecnológicos recientes en ICP-OES, como instrumentación de inyección de muestra y acoplamiento con técnicas de análisis en flujo, la han convertido en una de las herramientas más importantes en el análisis de muestras para la cuantificación de metales [83].



Figura 2. ICP-OES Perkin Elmer Optima 5300

2.2 Técnicas de análisis en flujo

El uso de técnicas de análisis en flujo permite el desarrollo de métodos total o parcialmente automatizados. En cualquier caso, se logran una serie de ventajas como la reducción al mínimo de la manipulación de los reactivos o la muestra por parte del analista, evitando la contaminación cruzada y favoreciendo el resguardo de su seguridad. Además, se obtiene reducción en el consumo de muestras y reactivos, se mejora la reproducibilidad de los métodos en comparación con métodos analíticos manuales, hay una disminución significativa del tiempo y costo de análisis, y por supuesto favorece la química verde [84].

Las técnicas de análisis en flujo surgieron en la década de los 50, con el desarrollo de la técnica de análisis en flujo segmentado (SFA), a partir de este han ido evolucionando y desarrollando a través del tiempo, algunas de ellas se mencionan a continuación por orden de aparición: análisis por inyección en flujo (FIA), análisis por inyección secuencial (SIA), análisis por inyección en flujo multiconmutado (MCFIA),

análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA), Lab-on-Valve (LOV), sistema en flujo multibomba (MPFS) [85] y el Lab-in-Syringe [86,87].

Una revisión más exhaustiva de las técnicas de análisis en flujo puede hallarse en libros especializados [84,88] y un gran número de artículos [89–92] que tratan los aspectos sobre sus fundamentos, características y aplicaciones. Los métodos en flujo más utilizados para el análisis de metales han sido las técnicas FIA y SIA, pero con el surgimiento de técnicas alternativas como MSFIA, LOV y MPFS se han estado desarrollando nuevas metodologías.

2.2.1 MSFIA

La técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) fue desarrollada en 1999 por V. Cerdà, et al, pertenecientes al grupo de Química analítica, Automatización y Medio Ambiente del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares. Esta técnica destaca por su versatilidad en comparación con las técnicas anteriores, ya que reúne las ventajas intrínsecas de las técnicas predecesoras, tales como la alta frecuencia de análisis de la técnica FIA, y mantiene la robustez de la técnica SIA, así como su bajo consumo de reactivos y su versatilidad. Simultáneamente se complementa con el uso y simplicidad del acoplamiento de válvulas solenoides de conmutación utilizadas por la técnica MCFIA.

La técnica MSFIA está desarrollada a través de un módulo o bureta multijeringa (Figura 3) que tiene un motor que propulsa simultáneamente 4 pistones que sostienen 4 jeringas, trabajando en un modo multicanal, semejante a la técnica FIA, pero con tubos a base de teflón evitando el uso de tubos de Tygon de las bombas peristálticas, que son frágiles.

Las jeringas tienen una válvula solenoide de conmutación de tres vías en la parte superior (cabeza), para direccionar los líquidos y permitir su conexión al sistema (posición “on”) o al depósito de reactivo (posición “off”). Por lo tanto, se tienen dos direcciones o dos acciones, un movimiento para dispensar y otra dirección para aspirar líquido [85]. El cambio de posición de las válvulas es independiente del movimiento del pistón, que no se detiene en la conmutación debido a la rapidez con que se genera el cambio [93].



Figura 3. Módulo multijeringa (Técnica MSFIA)

El manejo de las válvulas en combinación con las jeringas logra una disminución en el consumo de reactivos y una reducción alrededor de 10 veces en la generación de residuos respecto a los procedimientos que utilizan técnicas clásicas de inyección en flujo. Los diferentes volúmenes de las jeringas que se pueden utilizar permiten obtener diferentes caudales a través de un mismo conjunto de tuberías.

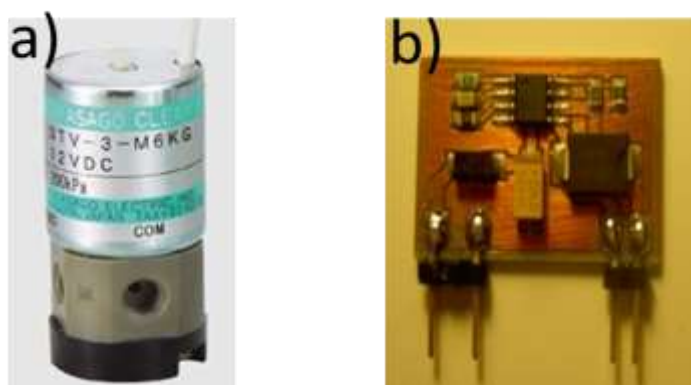


Figura 4. Válvula solenoide externa de tres vías (a) y plataforma protectora de válvulas (b)

La bureta multijeringa posee una regleta con cuatro salidas en su parte posterior, a cada una de las cuales se le puede conectar hasta tres válvulas solenoides externas (Figura

4a). Para evitar el sobrecalentamiento de las válvulas se incorpora un circuito electrónico de protección (Figura 4b). La técnica MSFIA es controlada a través de un ordenador, incluyendo los módulos adicionales que se anexen al sistema, como válvulas externas o un muestreador automático [85]. Es importante mencionar que una de sus limitaciones es la interrupción periódica del movimiento para llenar las jeringas, disminuyendo la frecuencia de análisis [94]. Sin embargo, las ventajas y su posibilidad de combinarse con otras técnicas hacen que la técnica MSFIA sea una herramienta muy útil para obtener nuevos métodos automatizados miniaturizados y simples.

2.3 Métodos de preconcentración

Los métodos de preconcentración son procedimientos analíticos que generalmente consisten en la extracción de analitos de interés de la matriz de una muestra; el método utilizado dependerá de la matriz de la muestra y sus componentes. Existen diferentes tipos, pero los más empleados en química analítica para la cuantificación de concentraciones menores son la extracción líquido-líquido (LLE), y extracción en fase sólida (SPE) [95]. En relación a la química analítica verde, la técnica SPE sobresale respecto a otras técnicas de preconcentración [96].

Existen diferentes métodos de retención, separación y enriquecimiento de iones metálicos, como el intercambio iónico, extracción con disolvente, técnicas electroanalíticas y filtración por membrana [97]. Dichos métodos nos permiten la separación de los analitos de la matriz de la muestra para su cuantificación.

2.3.1 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) desempeña un papel crucial en el pretratamiento de la muestra, debido a que proporciona características analíticas esenciales para el desarrollo de nuevas metodologías, tales como bajo consumo de disolvente, altas eficiencias de preconcentración, alta reproducibilidad, bajo costo y reducción en los tiempos de procesamiento. Es uno de los procedimientos más comunes para la limpieza, extracción u obtención de fracciones de contaminantes trazas en diferentes tipos de muestras. Los

pasos básicos que se contemplan para esta técnica son los siguientes: a) Acondicionamiento del material adsorbente, b) Cargar o hacer pasar la muestra por la fase sólida, c) Lavar el material adsorbente para eliminar cualquier componente no deseado y d) Elución de los analitos [98,99]. En la Figura 5 se puede observar un esquema general de estos pasos.

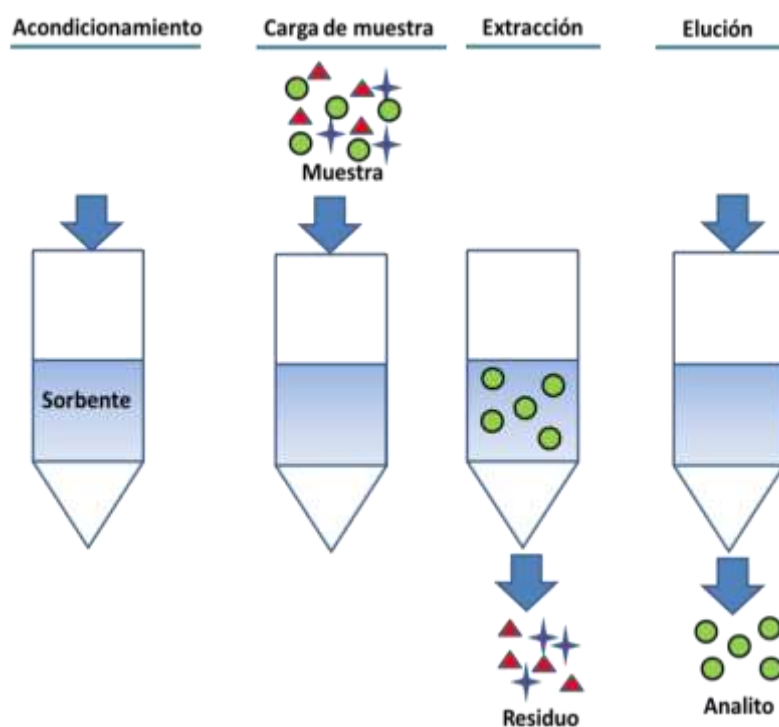


Figura 5. Esquema general del proceso de extracción en fase sólida

Los formatos más utilizados son los cartuchos, membranas o discos, puntas de pipeta y placas múltiples, aunque cada formato dependerá de la naturaleza del material adsorbente. Los materiales adsorbentes se pueden clasificar en óxidos orgánicos, adsorbente no específico o adsorbente de componente específico, pero actualmente se han introducido materiales nanoestructurados (nanomateriales a base de carbono, nanofibras, dendrímeros, nanopartículas magnéticas, inmunosorbentes, adsorbentes mixtos o modificados) y polímeros impresos que han logrado mejorar las características analíticas de las metodologías [100].

El material adsorbente para la retención de metales debe tener la posibilidad de extraer una gran cantidad de elementos en un amplio rango de pH, adsorción y elución en el menor tiempo posible para su cuantificación, además de tener una alta capacidad,

regenerabilidad y accesibilidad. Algunos de los materiales más populares y que cumplen estas condiciones son los materiales quelantes, carbón activado, sílice modificada celulosa y espuma de poliuretano [101].

2.3.2 Extracción basada en disco

En 1989, la empresa 3M, Inc. (St. Paul, MN, EUA) desarrolló e introdujo al mercado los discos extractantes Empore, y a partir de ahí su uso se ha incrementado debido a la diversificación de materiales y a la obtención de nuevas membranas. Con estos discos se pueden operar volúmenes de eluyente menores y utilizar caudales mayores respecto al uso de cartuchos. Además, el tamaño de partícula es un parámetro muy importante para la SPE, el formato de disco tiene menor tamaño de partícula (8 μm) en relación con el material en cartuchos (40 μm), mejorando el rendimiento de extracción porque tiene una mayor área superficial, por consecuencia se requiere menor cantidad de material adsorbente y un volumen menor de eluyente. También el aumento de la densidad y la uniformidad del empaquetamiento permiten el uso de caudales más altos, reduciendo el tiempo de extracción y favoreciendo la frecuencia de análisis [102].

Los discos comerciales más empleados para el pretratamiento de muestras son los fabricados a base de octadecilsilano (C18) o octilsilano (C8) enlazado a sílice, usados comúnmente para la extracción de compuestos no polares y moderadamente polares; también se pueden mencionar los discos a base de poli(estireno-divinilbenceno), carbón activado, modo mixto o discos a base de polímeros funcionalizados con grupos de ácido sulfónico o intercambiadores de iones de amina cuaternaria.

En el caso de los iones metálicos se han empleado por octadecilsilano unido a sílice y discos de poli(estireno-divinilbenceno) para el análisis de trazas de plata, níquel, cobre, hierro, cadmio o cromo, que son retenidos a través de métodos directos con disco modificado o en fase reversa. También se ha aplicado ampliamente el disco quelante, el cual puede retener varios elementos y tiene un rendimiento mayor para el análisis elemental en comparación con los otros discos [103].

2.3.3 Extracción con disco rotatorio

Con la finalidad de mejorar el rendimiento de la técnica de extracción con disco, surgió la técnica de extracción con disco giratorio (RDSE) que consiste en un disco como material adsorbente adherido a un imán [104], que hace posible la agitación como medio para mejorar la transferencia de masa entre el material y la disolución acuosa que contiene los analitos de interés. Esta técnica obtiene mejores recuperaciones, mayor repetibilidad en los resultados y permite reutilizar el material para varias repeticiones [105]. Un esquema general de la técnica antes descrita se encuentra en la Figura 6.

La simplicidad de su configuración hace que se pueda fabricar dentro del mismo laboratorio y permite la inmovilización en un área superficial expuesta mayor respecto a otras técnicas semejantes, como la SPE con barra de agitación (SBSE). El uso de esta técnica se ha limitado en compuestos orgánicos [105–107], por lo que en esta tesis se desarrolla un objetivo específico aplicando esta técnica para analitos inorgánicos.

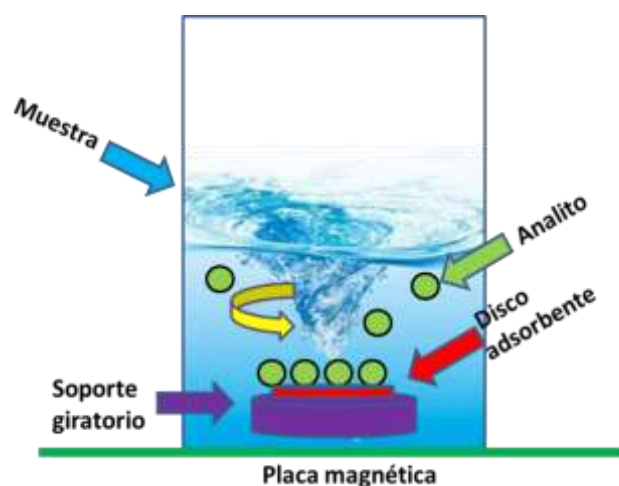


Figura 6. Esquema general de la técnica de extracción con disco rotatorio

2.4 Técnicas de impresión 3D aplicadas a química analítica

La fabricación por adición, también conocida como impresión en tres dimensiones (3D), se ha convertido en una tecnología esencial para la evolución de múltiples campos

científicos, incluyendo medicina, biología, química, bioquímica y nanotecnología [108]. El proceso de diseño e impresión de dispositivos impresos 3D se inicia con la creación de un modelo virtual (diseño) que se desea imprimir; la creación del modelo se logra mediante el uso de un programa informático de diseño asistido por computadora. Una vez que se tiene el diseño, se elige el tipo de formato digital, en el caso de la impresión 3D se utiliza el formato mallas 3D (mallas de elementos triangulares- *.STL). Finalmente, se fabrica el dispositivo mediante el programa informático específico de la impresora [109,110]. En el área de la química analítica, la técnica de deposición capa por capa (impresión 3D) se ha estado utilizando específicamente en el diseño de dispositivos fluidicos novedosos, innovadores y de bajo costo para la automatización de diferentes metodologías analíticas [111–113]. Con la impresión 3D se han fabricado dispositivos micro/mesofluídicos con geometrías complejas, obteniendo diversas ventajas como mejor reproducibilidad y disminución de tiempo y costos [114,115]. En la actualidad, se han desarrollado diferentes técnicas de impresión 3D basadas en los siguientes métodos: estereolitografía (SLA), modelado por deposición fundida (FDM), sinterizado selectivo por láser (SLS) y tecnología PolyJet, entre otros [116,117].

La impresión 3D ha dado lugar a investigar y/o diseñar dispositivos basados en flujo [108,113,118–121], nuevas arquitecturas de electrodos conductores [109], dispositivos SPE [122,123], dispositivos para microelectroforésis de flujo libre [124], celdas de flujo para detección de quimioluminiscencia [125] o la integración de válvulas de inyección para un sistema de flujo acoplado a ICP-MS [126]. Dentro de las ventajas de la utilización de impresión 3D, se destaca la simplicidad de fabricación, rapidez y bajo costo de arquitecturas fluidicas complejas, que han permitido el desarrollo de nuevos dispositivos para la preparación de muestras [127–129].

2.4.1 Estereolitografía

La estereolitografía (SLA) es una de las técnicas más convencionales de la fabricación capa por capa, cuyo potencial se basa en la velocidad y simplicidad de la producción de prototipos con función específica. Esta técnica se basa en el proceso de fotopolimerización o curado de resinas fotosensibles, utilizando la luz ultravioleta (láser de luz ultravioleta) para la polimerización de la resina o material fotoactivo [112,130,131]. Los acrilatos y los monómeros epoxis son los materiales más utilizados en

esta técnica de impresión, debido a la rapidez de su polimerización. Estos compuestos tienen un inhibidor residual que implica que los dispositivos impresos necesiten una etapa de curado en una cámara ultravioleta para finalizar el proceso de polimerización [132].

Se debe considerar la selección apropiada de precursores o monómeros poliméricos comerciales, debido a que estos materiales contienen fotoiniciadores, inhibidores y reticulantes que podrían permitir la posibilidad de uso de los dispositivos en entornos líquidos [133].

Se han desarrollado diferentes dispositivos microfluídicos a través de esta técnica, alcanzando resoluciones sub-micrométricas, lo que permite su aplicación en química analítica; además, los dispositivos impresos 3D no muestran porosidad en su estructura, por lo que se pueden acoplar a técnicas automatizadas en flujo [134]. La técnica SLA se puede utilizar de manera efectiva para la fabricación aditiva de nanocompuestos complejos [135]. Se muestra un ejemplo de impresora 3D-SLA (Form 2, Formlabs) en la Figura 7. Se ha utilizado esta impresora en la fabricación de dispositivos que se implementaron en esta tesis.

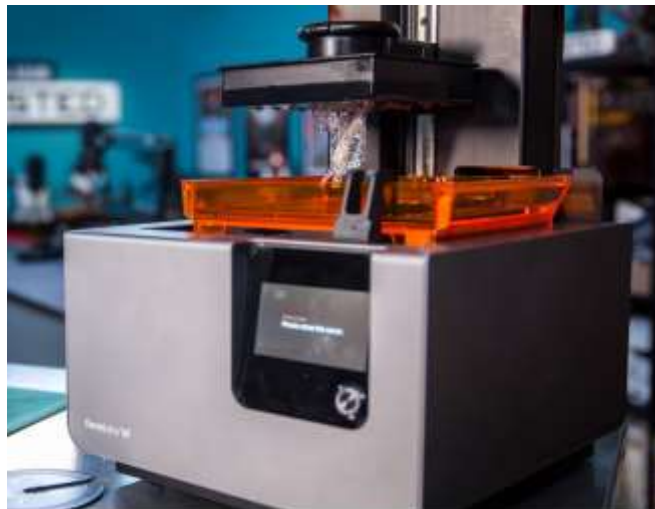


Figura 7. Impresora 3D basada en la técnica SLA (Form 1, Formlabs)

CAPÍTULO 3

Objetivos

3.1 Hipótesis

Las técnicas de análisis en flujo, la fabricación de dispositivos impresos 3D y/o la utilización de nuevos recursos ópticos permiten el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de metales, con mejores características, tales como una disminución en los límites de detección y en el consumo de reactivos. Su aplicación al análisis de muestras ambientales puede ser a través de análisis directo o acoplado a métodos de pretratamiento de muestra, como la extracción en fase sólida en diferentes versiones.

3.2 Objetivo general

Desarrollar, implementar y validar nuevas metodologías analíticas para la determinación de metales de interés ambiental, basadas en las técnicas de análisis en flujo, el desarrollo de dispositivos impresos 3D y el uso de nuevos recursos ópticos.

3.3 Objetivos específicos

- I. Implementar un método automático de cribado para la determinación espectrofotométrica de bismuto, utilizando una celda de flujo de largo paso óptico (LWCC).
- II. Desarrollar un método automático incorporando un dispositivo impreso 3D con estructuras integradas para la pre-concentración, especiación y determinación de hierro con detección espectrofotométrica.
- III. Implementar un método automático para la pre-concentración y determinación de cromo (VI) evaluando la resistencia de los dispositivos 3D frente a los disolventes orgánicos utilizados en el proceso de elución.

- IV. Evaluar la inmovilización de disco adsorbente utilizando una resina fotoactiva para su aplicación en la técnica de extracción con disco rotario para la pre-concentración y determinación de metales de interés ambiental.

- V. Revisar el estado del arte de la extracción en fase sólida automatizada, para visualizar los nuevos avances desarrollados en este tema, y conocer las tendencias e impactos que se han tenido con la introducción de la impresión 3D, así como los nuevos materiales implementados en química analítica para el pretratamiento de muestra.

CAPÍTULO 4

Desarrollo experimental

En este capítulo se presentan los procedimientos, materiales y fundamentos químicos que se utilizaron para el desarrollo de las metodologías planteadas en los objetivos específicos.

4.1 Metodología

La metodología planteada para cada técnica desarrollada en esta tesis consta de 7 pasos principales (Figura 8). Cabe señalar que cada objetivo específico representa el desarrollo de una nueva técnica, excepto el objetivo específico 5, que es una revisión bibliográfica. En la Figura 8 se presenta un esquema referente a las etapas que se siguieron para obtener los resultados.

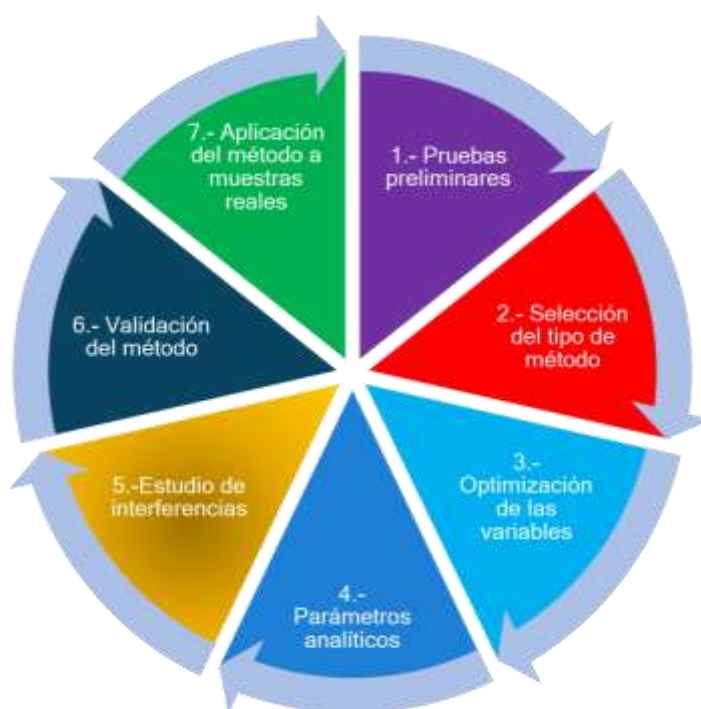


Figura 8. Etapas del desarrollo experimental para la obtención de las metodologías analíticas

A continuación se describe de forma detallada cada una de las etapas realizadas para cada metodología desarrollada en esta tesis:

1. Pruebas preliminares. En este paso se realizaron pruebas iniciales para elegir las condiciones químicas en las que se pudiese desarrollar la metodología, probando diferentes reactivos, materiales adsorbentes o dispositivos.

2. Selección del método. Se llevó a cabo la elección de la manera de realizar la metodología, es decir, elegir entre la forma automática o la manual. Para el caso de los métodos automáticos, en esta etapa se selecciona el tipo de técnica de análisis en flujo a emplear, la construcción del manifold y el desarrollo del método analítico.
3. Optimización de las variables. En esta etapa se seleccionan los métodos univariantes o multivariantes dependiendo de los requerimientos de cada método, y se obtienen los valores óptimos para las variables que influyen en la señal analítica.
4. Parámetros analíticos. Se llevan a cabo las actividades para determinar los parámetros analíticos, tales como rango lineal de trabajo, límites de cuantificación y detección, coeficiente de correlación de la curva de calibración, frecuencia de análisis y precisión.
5. Estudio de interferencias. Se estudian los iones interferentes que pueden afectar la señal analítica, así como su nivel de tolerancia. En caso de ser necesario, se lleva a cabo un estudio de agentes enmascarantes.
6. Validación del método. Se lleva a cabo a través del análisis de materiales de referencia certificados, por comparación entre técnicas y/o con el método adición- recuperación.
7. Aplicación del método a muestras reales. Se evalúan los métodos obtenidos aplicándolos al análisis de muestras reales, principalmente ambientales.

4.2 Métodos químicos

4.2.1 Determinación de bismuto

El bismuto se puede determinar por diferentes técnicas espectrométricas, pero en este caso se planteó el desarrollo de un sistema miniaturizado para su determinación, utilizando la espectrofotometría, que a su vez requiere de una reacción cromogénica. Esto corresponde al objetivo específico 1. En la literatura existen diferentes reactivos cromogénicos que pueden formar complejo colorimétrico con el Bi, como el azul de metiltimol [136], naranja de xilenol [137], ácido *N*-(2-acetamido)iminodiacético [138], tetrametilenditiocarbamato de plomo [139], entre otros.

Para el método propuesto se eligió el azul de metiltimol, utilizado con mayor frecuencia en la determinación de bismuto, junto con el naranja de xilenol, debido a su afinidad estructural y química. El azul de metiltimol es de color amarillo en medio ácido y azul o morado en el rango de pH entre 5.4-11, y pertenece al grupo de los reactivos basados en el ácido iminodiacético, como es el caso del complejante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El bismuto reacciona con el azul de metiltimol en condiciones ácidas, por lo que puede formar complejos de estequiometría 1:1 o 2:1 en función de la cantidad de analito y del reactivo [136]. El complejo bismuto-MTB es de color rojo –violeta, en la Figura 9 se puede observar la estructura del este complejo.

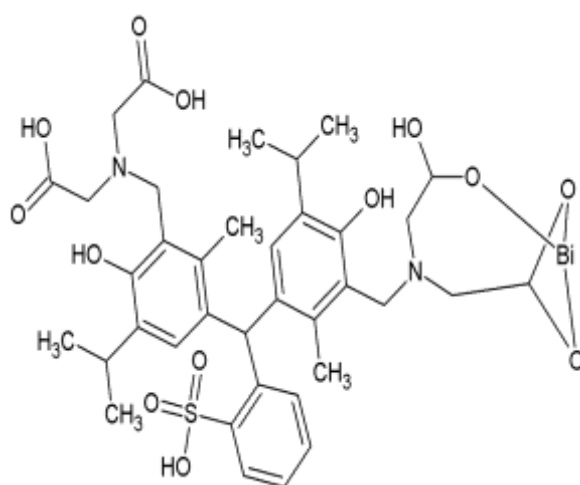


Figura 9. Complejo Bi (III)- MTB utilizado para la determinación espectrofotométrica de bismuto con el sistema MSFIA-LWCC

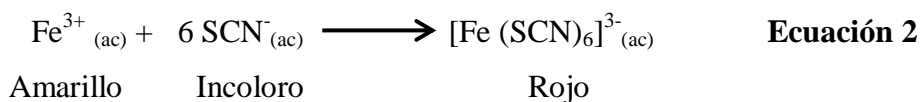
En la determinación de bismuto con azul de metiltimol se puede adicionar polivinilpirrolidona (PVP) para aumentar la solubilidad del reactivo en medio acuoso y producir un efecto batocrómico, es decir, desplazar el máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores, provocado por el aumento de polaridad en el medio [140]. El PVP se utilizó en el desarrollo de este método para la determinación de bismuto con el propósito de eliminar interferencias en las condiciones ácidas utilizadas.

4.2.2 Determinación, especiación y preconcentración de hierro

Para cumplir con el objetivo específico 2, se planteó desarrollar un método para la preconcentración, especiación y determinación de hierro basado en la detección espectrofotométrica. El proceso de preconcentración y especiación se llevó a cabo a través de la SPE basada en disco, utilizando un disco quelante para la retención de Fe (III) y su posterior análisis. Luego se lleva a cabo una reacción de oxidación con H_2O_2 para la conversión de Fe (II) a Fe (III), obteniendo una señal de hierro total. La concentración de Fe (II) es calculada por diferencia entre el total y el Fe (III). La desorción de los analitos se obtiene utilizando una disolución ácida [141].

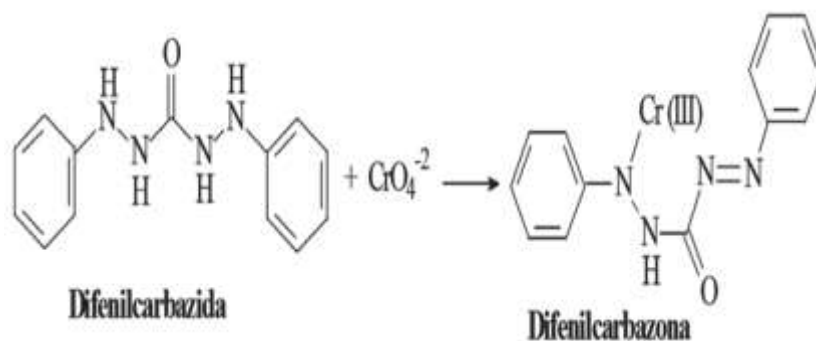
El disco quelante está compuesto de partículas conformadas por copolímeros de poli(estireno-divinilbenceno) funcionalizadas con grupos iminodiacetato, unidas por fibras de politetrafluoroetileno [142]. Dichos grupos actúan como agentes quelantes o ligandos que contienen dos o más átomos dadores de electrones que pueden formar enlaces coordinados con un solo ion metálico y con átomos donantes sucesivos, creando un anillo que contiene el ion metálico. La estabilidad del complejo formado depende de la relación entre el tamaño del ion metálico y el diámetro de la corona. Este quelante tiene una afinidad por elementos de transición multivalentes (principalmente 2+ y 3+), y se unirá mejor con alcalinotérreos en comparación con los iones de metales alcalinos. La elución se logra con una disolución ácida (3 moles L^{-1} HNO_3 o HCl), de acuerdo a los datos del fabricante (3M Empore).

Posterior al procedimiento de SPE, se realizó la reacción colorimétrica, por lo que fue necesario elegir el reactivo complejante. Los ligandos que se unen selectivamente al hierro, o a un estado de oxidación particular de este elemento con gran absorptividad molar, son principalmente el tiocianato, 2,2-bipiridilo o 2, 2', 2''-tripiridilo, 1,10-fenantrolina, batofenantrolina y 2, 4 ,6-tripiridil-1, 3,5-triazina, siendo estos últimos los de mayor absorptividad [143]. El método desarrollado requería la formación del complejo en medio ácido, ya que el eluyente de la SPE tiene estas condiciones, para lo cual se eligió el tiocianato de amonio que cambia de incoloro a un color rojo al formarse el complejo. El método explicado en esta sección se ha aplicado en trabajos previos con buenos resultados [141,144,145], y la reacción estequiométrica se describe en la Ecuación 2.



4.2.3 Determinación y preconcentración de cromo (VI)

En el objetivo específico 3 se propuso obtener un método analítico para la determinación de Cr (VI) utilizando un dispositivo impreso 3D, incluyendo la SPE basada en disco con detección espectrofotométrica. Se seleccionó el método basado en la formación del complejo Cr (III)-difenilcarbazona a partir del reactivo 1,5-difenilcarbazona (DPC) en la presencia de Cr (VI). Esta reacción es altamente selectiva (Ecuación 3), siendo muy utilizada para la extracción en fase reversa del Cr (VI) con detección espectrofotométrica [146–148].



Ecuación 3

El sistema propuesto se basa en la retención del complejo formado en un material adsorbente. Entre los diferentes extractantes utilizados para la preconcentración de Cr (VI) a través de SPE, están las resinas particuladas [149–151], discos [152], grafeno [149], nanotubos de carbono [153], nanopartículas magnéticas [154] y otros materiales inorgánicos (zirconio, alúmina) [155,156]. En el método propuesto, la retención del complejo se llevó a cabo con disco adsorbente como fase sólida para la preconcentración, y se evaluaron diferentes tipos de este formato.

4.2.4 Determinación y preconcentración multielemental basada en disco

En la determinación de metales propuesta en esta tesis a través del objetivo específico 4, se estableció como método de preconcentración la SPE basada en disco para la retención de metales. La evaluación del disco quelante se hizo con un patrón estándar X26 (Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, Ti, V, Zn; 100 mg L⁻¹ de cada elemento, Scharlau) conteniendo 5% (v/v) de HNO₃. El método químico establecido para este trabajo fue el sugerido por el fabricante del material. El acondicionamiento previo del disco consistió en pasar agua, luego una disolución 3 mol L⁻¹ de HNO₃ y finalmente una disolución de acetato de amonio (0.1 mol L⁻¹) a través del material utilizando un sistema de filtración. La etapa de extracción requiere un pH para la retención de los metales de 5.3 (0.1 mol L⁻¹ acetato de sodio), y como eluyente se recomienda una disolución de HNO₃ de 3 mol L⁻¹. Para la extracción con RDSE utilizada en este método se analizaron 14 metales, que se muestran en el capítulo 8.

La detección de los analitos se hizo por ICP-OES, utilizando como carrier una disolución 2% de HNO₃ (v/v).

4.3 Instrumentación y programas informáticos

La instrumentación utilizada se describe en la sección correspondiente de cada uno de los métodos desarrollados, con sus respectivos parámetros de uso. En relación al programa informático, se han utilizado diferentes programas en el desarrollo de esta tesis con fines específicos, en esta sección se describirá cada uno de ellos, haciendo énfasis en el programa informático de adquisición y control de datos.

- Programa AutoAnalysis.- Este programa informático fue desarrollado por el grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente de la Universidad de las Islas Baleares de Palma de Mallorca, España. Dicho programa se divide en una aplicación principal y un conjunto de bibliotecas de enlace dinámico (DLL's) que permiten la conexión de los instrumentos al ordenador y su control. Además, está diseñado para ofrecer al usuario una gran versatilidad en la automatización de métodos analíticos. Así, mediante una selección apropiada de módulos instrumentales y las DLL's necesarias, el paquete de programas AutoAnalysis permite la aplicación automática o semiautomática de un gran número de técnicas

en flujo (por ejemplo, FIA, SIA, MCFIA, MSFIA, LOV, etc.). Dentro de las ventajas que ofrece el programa AutoAnalysis se encuentran: 1) permite la resolución de varios problemas analíticos con el mismo programa, lo que evita la utilización de varios programas, simplificando así el procedimiento; 2) permite que todo el personal del laboratorio utilice el mismo programa en distintas aplicaciones, por lo tanto es más fluido el intercambio de experiencia y opiniones; 3) AutoAnalysis se ha diseñado para la plataforma Win32, lo que permite que mientras se está utilizando este programa, se pueda estar trabajando simultáneamente con otros programas (por ejemplo procesadores de texto, navegadores, hojas de cálculo, presentaciones, etc.); 4) permite el uso de variables e instrucciones condicionales, además cuenta con su lenguaje propio, por consecuencia permite el desarrollo de métodos inteligentes [85].

- Programa Statistica 6.- Este programa informático puede acceder a los datos de prácticamente todos los repositorios de datos estándar, formatos de archivo y formatos de bases de datos estándar y especializados. Además, ofrece la selección más completa de algoritmos avanzados de datos en un solo paquete, esta información son datos proporcionados por su autor (Statsoft, EUA). Tiene opciones integrales para gráficos de control de calidad, métodos de control multivariante, métodos de control de calidad basados en modelos y algoritmos de supervisión de procesos simples y avanzados. Incluso se proporcionan algoritmos avanzados de simulación y optimización general.
- Programa Rhinoceros 5.0.- Con este programa informático se pueden crear, editar, analizar, documentar, renderizar, animar y traducir curvas NURBS* (B-splines racionales no uniformes), superficies y sólidos, nubes de puntos y mallas poligonales. La versatilidad de este programa se debe a las herramientas ilimitadas de modelado 3D de forma libre, además se tienen ventajas como la precisión necesaria para el diseño, los prototipos, la ingeniería, el análisis y la fabricación de cualquier producto, compatibilidad con la mayoría de programas de diseño, es rápido y de bajo costo.

4.4 Metodologías de optimización

La optimización de los métodos desarrollados se llevó a cabo de forma univariada y/o multivariada con el objetivo de conocer los factores que tienen una influencia en los valores de la respuesta analítica. Se establecieron los niveles de los factores que dan lugar a condiciones óptimas y así predecir los valores de la respuesta en un intervalo definido para los factores.

La selección del método de optimización se realizó tomando como referencia las variables de mayor impacto en la señal analítica y evitando que cubrieran el efecto de otras variables de menor impacto. En el caso de las técnicas basadas en un método químico establecido en trabajos previos, se optó por estudiar de manera individual las variables, es decir de forma univariada.

En cambio, para los métodos restantes se implementaron métodos multivariados a través de diseños experimentales. Los métodos de diseño experimental permiten sistematizar la forma de realizar los experimentos, y brindan la obtención de la máxima información posible con la mínima cantidad de experimentos [157]. El diseño estadístico de experimentos tiene como objetivo seleccionar la estrategia experimental óptima que permita obtener la información buscada con el mínimo coste, y además evaluar los resultados experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtengan. El diseño experimental es un conjunto específico de experimentos definidos por una matriz compuesta de las combinaciones de diferentes niveles de las variables estudiadas [158].

En química analítica se recomienda utilizar un diseño experimental para observar si existe un efecto en la señal analítica (método de cribado-screening) y consecutivamente, utilizar un diseño complementario para encontrar el valor crítico o en su caso, un valor óptimo para las variables. Dentro de los diseños experimentales de cribado, se encuentran los diseños factoriales, como el diseño factorial de k factores, especialmente el diseño 2^k , que proporciona el número menor de experimentos para los que pueden estudiarse k factores en un diseño factorial completo, donde cada uno tiene sólo dos niveles [159]. Después de este análisis se pueden evaluar y obtener las variables que estadísticamente son significativas.

Respecto a los métodos de obtención de valores óptimos, en química analítica se utilizan frecuentemente los métodos de superficie de respuesta, los cuales establecen un modelo cuadrático que permite encontrar condiciones críticas de estos factores. Los

métodos de superficie de respuesta que se han aplicado ampliamente en química analítica son la matriz Doehlert, factorial completo de tres niveles, compuesto central y diseños de Box Behnken [160]. En esta tesis se han aplicado el diseño central compuesto y la matriz de Doehlert, la selección de estos métodos fue en base a la cantidad de variables estudiadas.

4.5 Dispositivos impresos 3D

Las impresoras Form +1 y Form +2 (Formlabs) se utilizaron para la impresión 3D de todos los dispositivos empleados en esta tesis, obtenidos a través de la técnica SLA. Estas impresoras contienen funciones de orientar, apoyar y diseñar automáticamente sus modelos 3D con la finalidad de facilitar su manejo.

El procedimiento general de impresión de los dispositivos diseñados y fabricados, es el siguiente:

- **Diseño.** Se realizó a través del programa informático Rhinoceros 5.0, partiendo del boceto del dispositivo que se desea utilizar.
- **Importación de los datos.** Una vez validado el diseño, se extrae en formato *.STL, para transferir los datos a la impresora.
- **Impresión.** Se ha utilizado el programa Preform (Formlabs) para realizar la impresión, con este programa informático se han establecido las condiciones de impresión, la posición de impresión, la incorporación de soportes y la revisión del tiempo de impresión, así como las capas que se generan con el diseño. El tiempo de impresión depende de la posición de impresión, ya que en ciertas posiciones se generan más capas de impresión.
- **Limpieza.** Una vez realizada la impresión, los dispositivos se limpian con alcohol isopropílico para eliminar los monómeros no polimerizados. Algunos dispositivos requieren de un proceso de limpieza más especializado, para ello se utiliza una bomba de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que hace pasar el alcohol isopropílico por las estructuras complejas dentro del dispositivo, evitando la obstrucción de los canales diseñados.
- **Secado.** Durante 15 min a temperatura ambiente, para que se volatilice el alcohol remanente.

- Curado. Se colocan los dispositivos en una cámara ultravioleta CL-1000 (UVP, Upland, Canadá) con varias lámparas ultravioleta de 365 nm, durante un tiempo determinado (específico para cada dispositivo diseñado en esta tesis).
- Las especificaciones de impresión y dimensiones de los dispositivos se describen en los diferentes capítulos donde se ha utilizado un dispositivo impreso 3D.

Las resinas utilizadas para la impresión 3D pueden causar irritación en los ojos o piel, además de causar afectaciones en el sistema respiratorio. Debido a las afectaciones mencionadas anteriormente, se debe utilizar ropa y guantes de protección, así como una protección para los ojos y/o cara. La impresora 3D se debe colocar en un área ventilada bajo un sistema adecuado de ventilación o extracción. La composición de la resina utilizada en la impresión se describe en la **sección 6.3.2 Composición del dispositivo impreso 3D**.

4.6 Foto-inmovilización de disco adsorbente

El objetivo específico 4 plantea el uso de la inmovilización de disco adsorbente utilizando una resina fotoactiva para aplicarlo en la técnica RDSE, con el propósito de analizar muestras con matriz compleja. Para ello, se evaluaron adhesivos comerciales para inmovilizar el disco, pero en medios ácidos fuertes y aplicando agitación, el disco adsorbente se libera. Para solucionar este problema se propuso utilizar la misma resina de impresión (resina fotoactiva transparente-Formlab) como adhesivo.

Para lograr la fotoinmovilización del disco se utilizó el proceso de curado, que también se utiliza para los dispositivos impresos para terminar de polimerizar la resina. El tiempo en el proceso de curado es una variable determinante para evitar que el disco se libere, por lo tanto, se evaluaron diferentes tiempos de curado en un rango de 0-4 h. En las pruebas realizadas se establecieron tiempos crecientes de 30 minutos, el tiempo máximo estudiado se fijó en 4 h, porque es el tiempo en que se logra un mayor porcentaje de polimerización de la resina. El valor óptimo es 60 min para obtener la inmovilización del disco sobre el dispositivo impreso 3D. Los discos inmovilizados se sometieron a pruebas de agitación a 800 rpm durante un tiempo de 24 horas para evaluar su adhesión al dispositivo, sin observar ninguna afectación.

CAPÍTULO 5

**Método espectrofotométrico automatizado para la
determinación de bismuto utilizando una celda de flujo
de largo paso óptico**

5.1 Resumen

El desarrollo y la implementación de nuevos dispositivos que mejoran la sensibilidad y los límites de detección en los métodos espectrofotométricos, como es el caso de la celda de flujo de largo paso óptico (LWCC), hacen de especial interés su aplicación en el desarrollo de nuevas metodologías para la determinación de elementos trazas. En este capítulo se describe un método automatizado para la determinación directa de bismuto en muestras ambientales. El uso de la LWCC permite la determinación de bismuto en concentraciones bajas y con buena sensibilidad, sin la necesidad de requerir un método de preconcentración.

La reacción colorimétrica de Bi (III) con azul de metiltimol en medio ácido fue utilizada como método químico para la determinación de Bi. Adicionalmente, se utilizó polivinilpirrolidona para aumentar la solubilidad del reactivo cromogénico, y también para que en la etapa de detección presentara un efecto batocrómico, que provoca la eliminación de algunas interferencias en la cuantificación del complejo formado.

Las variables del método propuesto fueron optimizadas de forma multivariante con el propósito de obtener las mejores características analíticas y condiciones experimentales. Se obtuvo un rango lineal de trabajo de 4.9 - 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ y un límite de detección de 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ con una precisión de 1.4 % (expresada en RSD).

El sistema propuesto en este capítulo se aplicó al análisis de muestras ambientales y muestras farmacéuticas, estas últimas se utilizaron a su vez como muestras de referencia para validar el método. En el caso de las muestras ambientales (agua de pozo) se analizaron directamente, lográndose resultados satisfactorios para la determinación de bismuto.

El analizador de tamaño menor desarrollado está basado en la combinación de la técnica MSFIA con la LWCC y acoplado a un espectrofotómetro miniaturizado. Este sistema ofrece límites de detección comparables con los de metodologías costosas como ICP-OES, y brinda la posibilidad de una futura implementación en control de procesos o análisis en campo, debido a su simplicidad, rapidez y bajo coste de mantenimiento e instrumentación.

El método propuesto para la determinación de bismuto es totalmente automatizado. Los detalles del desarrollo de esta metodología se describen en este capítulo.

5.2 Experimental

5.2.1 Reactivos

Todas las disoluciones fueron preparadas con reactivos grado analítico y agua calidad Millipore. Los patrones de bismuto fueron preparados a partir de una disolución patrón de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de bismuto (Scharlau), los cuales contenían $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$. Otros reactivos utilizados para la determinación de bismuto se mencionan a continuación: ácido nítrico (65%, Scharlau), azul de metiltimol (MTB) – sal sódica (Panreac), polivinilpirrolidona (PVP) (Fluka), nitrato de aluminio noahidratado (Merck), ácido ascórbico, ácido fluorhídrico (48%), cloruro de sodio y nitrato de hierro noahidratado (Scharlau).

La preparación del reactivo cromogénico se llevó a cabo disolviendo la cantidad requerida de MTB en disolución acuosa conteniendo 6 g L^{-1} de PVP.

5.2.2 Muestras

Para la aplicación del método propuesto, las muestras fueron preparadas en $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$.

El desempeño del método para la determinación de bismuto fue evaluado a través de muestras de agua de pozo obtenidas de diferentes puntos de la isla de Mallorca (España). Por otra parte, con la finalidad de validar el método desarrollado, se analizaron muestras farmacéuticas que contenían diferentes tipos de compuestos de bismuto como subgalato de bismuto (Crema “Synalar rectal”), gluconato de bismuto (Disolución líquida inyectable “Labcatal”) o subcitrato de bismuto (Tableta “Gastrodenol”).

Las muestras de agua de pozo y la disolución líquida inyectable fueron analizadas directamente sin requerir la etapa de digestión, sólo se acondicionaron con disolución ácida ($0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$). El análisis de las muestras sólidas (tableta y crema) se llevó a cabo de la siguiente manera: se pesaron 0.2 g de la muestra, específicamente para la muestra en forma de tableta se realizó una etapa de trituración con mortero para homogenizarla. Las muestras fueron colocadas en el vaso digestor donde se agregaron 10 mL de ácido nítrico (65%), y finalmente se realizó una digestión con microondas utilizando un digestor de microondas (MLS-1200 Mega- Milestone). Para el

procedimiento utilizado para la digestión se aplicó el siguiente programa: 6 min a 250 W, 6 min a 400 W, 6 min a 650 W, 6 min a 250 W y 10 min sin potencia. El líquido procedente de la digestión se llevó a sequedad total y después se diluyó con 0.1 mol L^{-1} hasta el volumen requerido para el análisis.

5.2.3 Manifold y software

El sistema espectrofotométrico desarrollado para la determinación de bismuto se muestra en la Figura 10. La configuración está basada en una bureta multijeringa (BU4S; Crison Instruments, Barcelona, España), el sistema propuesto utiliza 3 jeringas de vidrio de 10 (S1), 5 (S2) y 10 (S3) mL (Hamilton, Bonaduz, Suiza). La jeringa S1 es usada para la inyección de la muestra y para la propulsión del carrier (H_2O), la jeringa S2 impulsa el reactivo cromogénico y la jeringa S3 direcciona el producto de la reacción hacia el detector. Adicionalmente, el sistema tiene 2 válvulas solenoides externas de 3 vías (V1, V2) (Takasago electric inc, Nagoya, Japón). El flujo es dirigido por las válvulas en los siguientes sentidos; en posición “on”: al sistema o detector y “off”: a los reservorios o residuos.

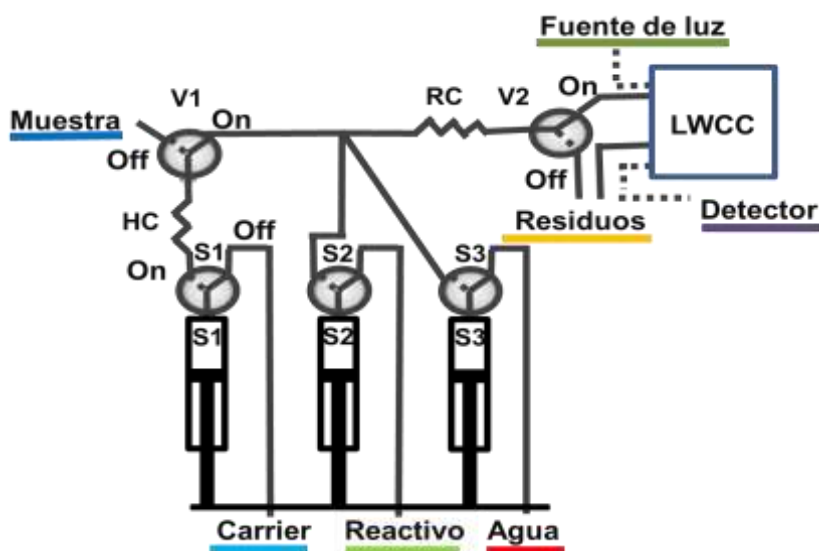


Figura 10. Esquema del MSFIA-LWCC para la determinación de bismuto. HC: Bucle de carga; LWCC: Celda de flujo de largo paso óptico; RC: Bucle de reacción; S: Jeringa; V: Válvula solenoide externa; Carrier: Agua

El manifold fue construido con tubería de politetrafluoroetileno (PTFE) de diámetro interno de 1.5 mm para la introducción de los reactivos y la muestra, y con tubería de 0.8 mm de diámetro para el resto del sistema. Se utilizó un bucle de carga (HC) para la introducción de la muestra con un volumen de 10 mL y un bucle de reacción (RC) para la mezcla de los reactivos. Además, se empleó un conector de 4 vías de polimetilmetacrilato para la unión de tuberías.

El sistema de detección fue construido con un espectrofotómetro miniaturizado USB2000 (Ocean Optics, EUA), conectado a un ordenador a través de una interfaz USB y acoplado a una celda de flujo de largo paso óptico (LWCC, World Precision Instruments, Inc. FL, EUA) que consta de 1 m de teflón tipo II AF (550 μm de diámetro interno; 100.0 ± 0.5 cm de longitud de camino efectivo; 240 μl de volumen interno). Además, se utilizaron 2 fibras ópticas de 400 y 600 μm de diámetro interno (Ocean Optics), una de ellas utilizada para conectar la fuente de luz halógeno-deuterio (DH-2000, Ocean Optics) y otra fibra para conectar el detector con la LWCC.

El complejo Bi-MTB puede ser medido a 548 o 600 nm, pero se obtuvo una máxima absorbancia del complejo Bi (III)-MTB a 600 nm en estudios preliminares, y como longitud de onda de corrección se eligió 760 nm.

Las muestras farmacéuticas fueron analizadas con un espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Optima 5300DV, Perkin Elmer Inc.) para la validación del método realizando una comparación entre las técnicas.

Para el control instrumental, la adquisición y procesamiento de datos se utilizó el programa informático AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems, Bunyola, España). La optimización multivariante fue realizada a través del programa informático Statistica 6 (Statsoft, EUA).

5.2.4 Procedimiento analítico

El procedimiento analítico para la determinación de bismuto con el método desarrollado se encuentra descrito en la Tabla 4 y se puede resumir de la siguiente manera: en primer lugar, para evitar la contaminación cruzada, se limpia la tubería localizada entre el bucle de carga (HC) y V1. Después, se introduce la muestra al sistema utilizando el bucle de carga, con V1 en posición "On". Consecutivamente, las jeringas S1 y S2 son activadas para dispensar la muestra y el reactivo cromogénico (posición "On"), respectivamente.

Este movimiento se realiza simultáneamente con la finalidad de mezclar ambos líquidos en el conector de 4 vías y se pueda formar el complejo en el bucle de reacción (RC). Finalmente, el producto de la reacción es enviado hacia el detector utilizando agua como carrier (Jeringa S3; posición “on”).

Tabla 4. Procedimiento analítico del sistema MSFIA-LWCC para la determinación de Bi

Paso	Operación	Caudal (mL min ⁻¹)	Jeringa (S1)	Jeringa (S2)	Jeringa (S3)	Válvula externa (V1)	Válvula externa (V2)
Cambio de muestra	Limpiando tubería						
	a) Aspirar 0.7 mL	1.5	On	Off	Off	Off	Off
	b) Dispensar 1.0 mL	1.5	On	Off	Off	On	On
	c) Aspirar 0.2 mL	1.5	On	Off	Off	Off	Off
	d) Dispensar 0.2 mL	1.5	On	Off	Off	On	On
	Limpiando bucle						
a) Dispensar 1.5 mL	1.5	Off	Off	On	Off	On	
Carga de muestra	a) Aspirar 0.5 mL	1.5	On	Off	Off	Off	Off
Reacción y cuantificación	a) Dispensar 0.5 mL	1.5	On	On	Off	On	Off
	b) Dispensar 2.0 mL	5	Off	Off	On	Off	Off

5.2.5 Optimización de condiciones experimentales

Las condiciones experimentales de operación del método desarrollado para la determinación de bismuto fueron optimizadas a través de un diseño experimental multivariante utilizando el programa estadístico Statistica. Inicialmente, se aplicó un método de cribado (screening) para encontrar las variables experimentales que afectan significativamente la señal analítica. Para este estudio se evaluaron 5 variables: concentración y volumen de MTB, caudal, longitud del bucle de reacción y volumen de muestra. Un diseño factorial completo 2^k fue utilizado como método de screening, tomando en cuenta los efectos individuales e interacciones de las variables.

Las variables con efectos significativos en la señal analítica se analizaron con un diseño central compuesto, incluyendo términos cuadráticos. Para la matriz de experimentos del diseño multivariante se incluyeron 3 puntos centrales y los rangos de las variables estudiadas se observan en la Tabla 5.

La variable del medio ácido se analizó de manera univariante debido a que su efecto podría cubrir el efecto de las variables restantes. Además, es una condición esencial para el desarrollo de la reacción colorimétrica [136]; los mejores resultados se observaron en un medio de $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$.

Tabla 5. Rangos experimentales y valores óptimos para el método propuesto

Variable	Rango Screening	Rango Diseño central compuesto	Valores óptimos
Concentración de MTB ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1 - 7	1 - 6	6
Volumen de MTB (mL)	0.1 - 0.5	0.1 - 0.4	0.5
Volumen de muestra (mL)	0.2 - 1	0.1 - 0.8	0.25
Caudal (mL min^{-1})	1 - 2	1.5	1.5
Longitud de bucle de reacción (cm)	25 - 100	100 - 200	100

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Condiciones químicas iniciales

La configuración propuesta y el uso de la técnica MSFIA permiten al método desarrollado realizar operaciones paralelas, y a su vez el acoplamiento a la celda LWCC permite mejorar los límites de detección, aumentando la sensibilidad del método para la determinación de bismuto. Con esta configuración se obtiene un método compacto, miniaturizado y portátil, que puede ser utilizado en mediciones “in situ”. En el método químico se utilizó el PVP para incrementar la solubilidad del reactivo cromogénico [136,140]. Se evaluó el efecto del PVP en la determinación de bismuto, y en los resultados obtenidos se observa que la presencia de PVP en la reacción colorimétrica muestra un incremento en la sensibilidad y provoca un efecto batocrómico, por consecuencia se logra eliminar posibles interferencias. La concentración de PVP se fijó en 6 g L^{-1} [136].

Otro aspecto relevante es el tiempo requerido para la formación del complejo de Bi (III)-MTB, esta variable fue optimizada de forma conjunta a través de la longitud del bucle de reacción. El tiempo mínimo de formación es de 5 s.

5.3.2 Optimización del método propuesto

El diseño factorial completo para 5 variables (2^5) establece 35 experimentos incluyendo 3 puntos centrales. Los resultados muestran que las 5 variables evaluadas y la curvatura son significativas en el dominio experimental establecido, con un intervalo de confianza del 95%, tomando como respuesta el ratio (proporción entre la señal analítica del complejo/blanco). Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo que incluye las interacciones de tercer orden, estos datos se analizaron con el diagrama de Pareto (Figura 11).

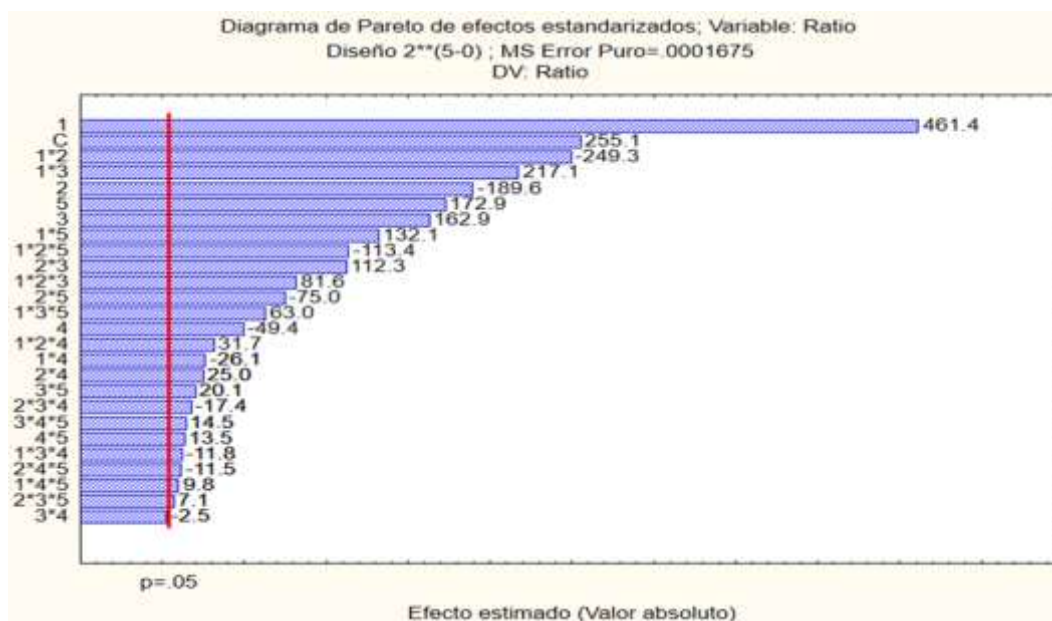


Figura 11. Diagrama de Pareto del screening 2^5 para 5 variables analizando la proporción entre la respuesta analítica muestra/blanco (ratio). C: Curvatura; 1: Concentración de MTB; 2: Volumen de MTB; 3: Volumen de muestra; 4: Caudal; 5: Longitud de bucle de reacción; *: Interacción de segundo o tercer orden

Las variables de concentración de MTB, longitud de bucle de reacción y volumen de muestra tienen un efecto positivo en la señal analítica, por lo cual se deben analizar en un rango mayor al estudiado. Respecto al volumen de MTB y el caudal, se observa un efecto negativo sobre la señal analítica. Solo la interacción de segundo orden entre volumen de muestra y caudal es no significativa.

Sin embargo, para observar el efecto global de las variables sobre la señal analítica se utilizó la función de deseabilidad (Figura 12). De los datos obtenidos con esta función se puede deducir que el caudal presenta un efecto de menor magnitud en la respuesta (señal analítica). Por lo tanto, se fijó a 1.5 mL min^{-1} con el propósito de evitar sobrepresión en el sistema y garantizar el máximo rendimiento de extracción. Los rangos de las variables restantes fueron modificados, de acuerdo a los resultados analizados en el método de screening. Los nuevos rangos establecidos se pueden observar en la Tabla 5.

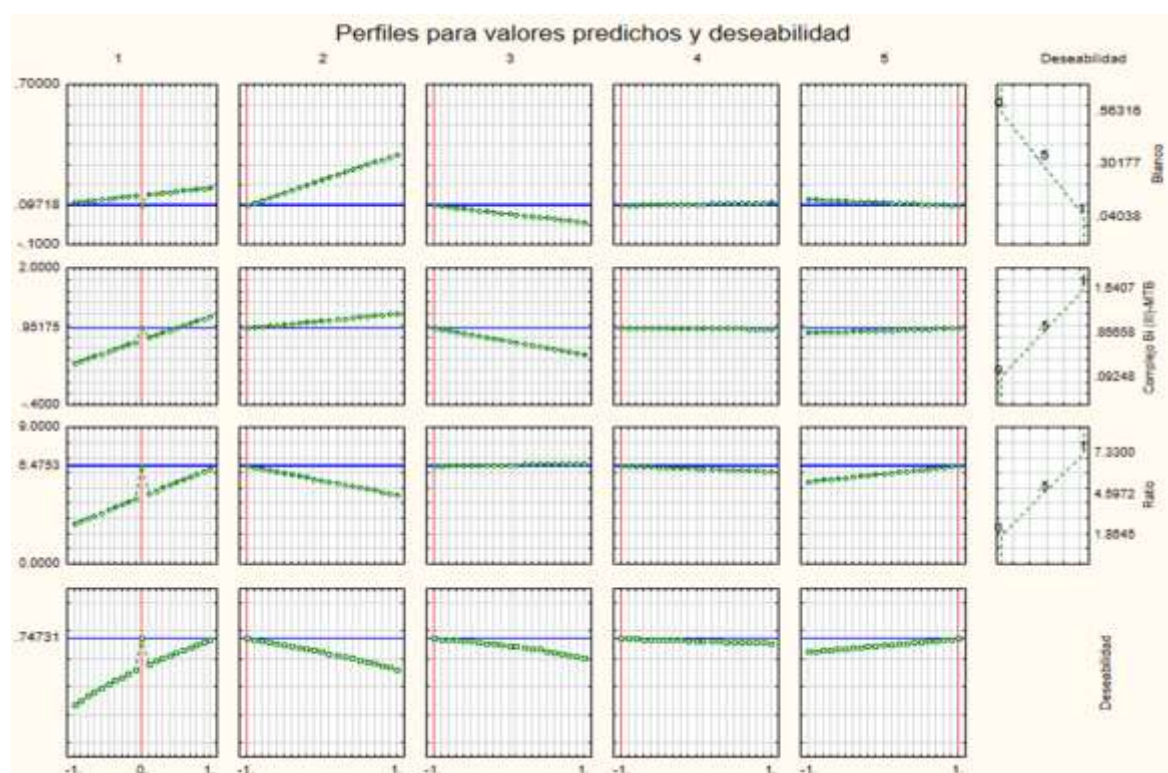


Figura 3.

Figura 12. Función de deseabilidad para el método de screening, analizando la señal del blanco, el complejo Bi (III)-MTB y el ratio. 1: Concentración de MTB; 2: Volumen de MTB; 3: Volumen de muestra; 4: Caudal; 5: Longitud de bucle de reacción

Con el propósito de obtener los valores óptimos, se realizó un diseño central compuesto para 4 variables incorporando términos cuadráticos, este diseño contempla un total de 27 experimentos. La función de deseabilidad fue utilizada para el análisis de la señal del blanco, complejo de Bi (III) -MTB y del ratio (Figura 13). El volumen de muestra presenta un máximo para la proporción de la señal muestra/blanco y la señal del

complejo Bi (III)-MTB, así como un mínimo para el blanco a 0.15 (valor codificado), correspondiente a 0.5 mL. La concentración de MTB presenta un máximo positivo hacia el límite superior del rango experimental para el complejo Bi (III)-MTB y el ratio, en cambio la señal del blanco no muestra una diferencia significativa. El volumen de MTB y la longitud del bucle de reacción no tienen efecto significativo en la respuesta.

Sin embargo, la señal del complejo Bi (III)-MTB y el blanco decrecen respecto al volumen del reactivo cromogénico. Por lo tanto, esta variable se analizó con los datos del ratio y se obtuvo como mejor resultado el nivel central del rango experimental, que fue seleccionado como el valor óptimo. El valor óptimo para la longitud del bucle de reacción fue el valor del límite inferior del rango experimental, ya que la señal decrece respecto al incremento de la longitud del bucle, ocasionado por la dispersión del producto de la reacción. El valor óptimo para esta variable fue de 100 cm. Los valores óptimos de las variables estudiadas en este trabajo se muestran en la Tabla 5.

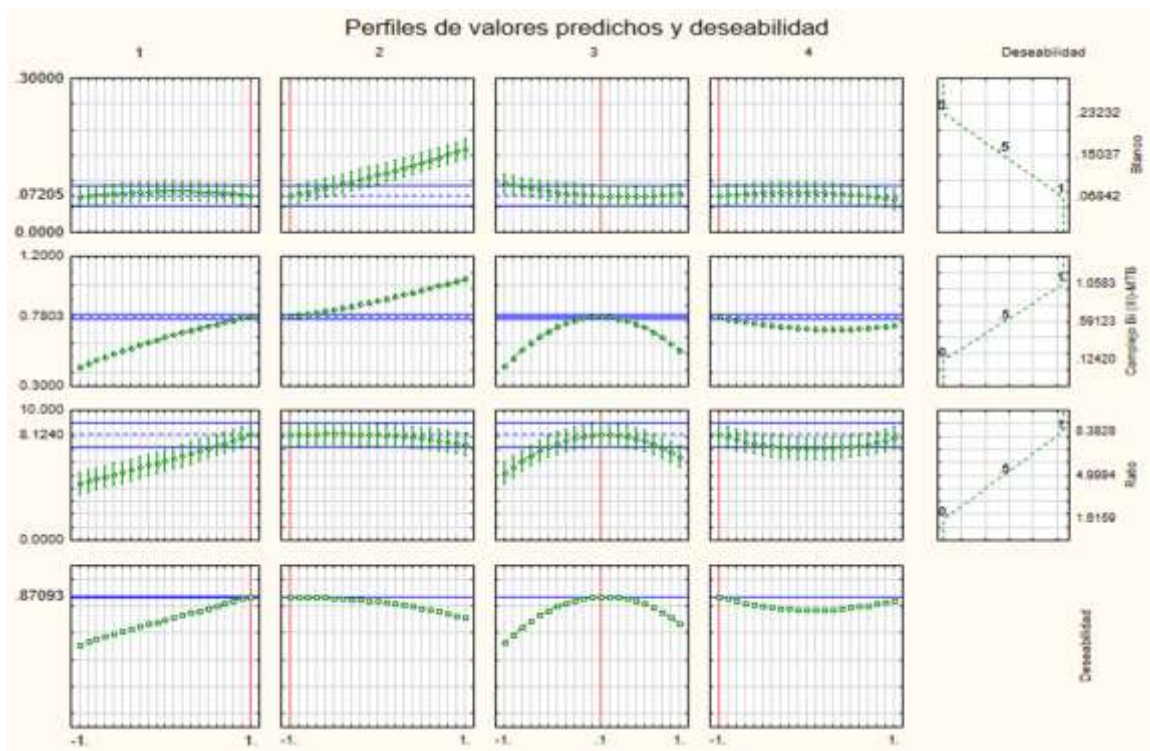


Figura 13. Función de deseabilidad para el análisis de la señal del blanco, el complejo Bi (III)-MTB y el ratio resultado del diseño central compuesto. 1: Concentración de MTB; 2: Volumen de MTB; 3: Volumen de muestra; 4: Longitud de bucle de reacción

5.3.3 Parámetros analíticos

Utilizando los valores óptimos obtenidos en la etapa anterior, el funcionamiento del método propuesto MSFIA-LWCC fue evaluado obteniendo los parámetros analíticos que se muestran en la Tabla 6.

La curva de calibración (absorbancia vs concentración en $\mu\text{g L}^{-1}$) para la determinación de bismuto fue obtenida con un resultado de ajuste estadístico satisfactorio ($y= 0.0018x - 0.0249$, $R^2=0.9982$, $n=8$). El rango lineal de trabajo para el método propuesto fue de 1.5 a 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ y el límite de detección (LOD) fue de 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla 6). El LOD se calculó a partir de 3 veces la desviación estándar de 10 réplicas del blanco dividido por la pendiente de la curva de calibración, de acuerdo a lo establecido por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) [161,162].

Tabla 6. Parámetros analíticos para el sistema MSFIA- LWCC

Parámetros analíticos	Valor
Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1.5
Límite de cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4.9
Rango lineal de trabajo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1.5-600
Sensibilidad ($\text{AU}/ \mu\text{g L}^{-1}$)	0.0018
Precisión intra-día (n=12, RSD %)	0.7
Precisión inter-día (n=5, RSD%)	1.4
Frecuencia de análisis (muestras h^{-1})	8
Frecuencia de inyección (muestras h^{-1})	30

La frecuencia de análisis fue de 8 h^{-1} . Se obtuvo midiendo el tiempo que se requería para analizar una muestra, que incluye la determinación del analito con tres réplicas y el cambio de muestra. En la frecuencia de inyección se midió el tiempo requerido para obtener sólo una respuesta (una réplica), y para el método propuesto fue de 30 h^{-1} . Como se puede observar en la Tabla 6, el límite de detección obtenido es menor en comparación con el logrado por Amin, et al [163], donde se desarrolla un método con SPE y detección espectrofotométrica, obteniendo un LOD 20 veces mayor (31 $\mu\text{g L}^{-1}$) en comparación con el método propuesto. Cabe señalar que el uso de la SPE disminuye la frecuencia de inyección. Otro método similar llevado a cabo de forma manual [164]

reporta un LOD con un orden de magnitud mayor que el logrado por el presente método ($12 \mu\text{g L}^{-1}$) y un rango lineal más corto.

La precisión intra-día fue evaluada como desviación estándar relativa (RSD) a partir de 12 inyecciones sucesivas de una disolución estándar de bismuto ($250 \mu\text{g L}^{-1}$), mientras que la precisión inter-día fue calculada a través del resultado de 5 diferentes días de trabajo ($n=5$), los resultados fueron 0.7% y 1.4%, respectivamente.

De acuerdo a la Tabla 7, se puede observar que los métodos automatizados que utilizan técnicas en flujo acoplados a una detección espectrofotométrica consumen mayor reactivo cromogénico en comparación con el método propuesto. El LOD del método desarrollado es 4.5 veces menor que el método reportado usando MCFIA [137] y 167 veces menor que el método que utiliza SIA [136].

El método propuesto tiene mayor precisión y menor tamaño instrumental, esto debido a la utilización de un espectrofotómetro miniaturizado. Sin embargo, el rendimiento de inyección es menor respecto a trabajos anteriormente reportados, debido a la etapa de lavado añadida para prevenir la contaminación entre muestras, y a que adicionalmente se utiliza un caudal menor debido a las condiciones de trabajo de la LWCC. No obstante, es notable la disminución del límite de detección y se sigue manteniendo el caudal de inyección en un nivel alto.

Tabla 7. Comparación del método propuesto con trabajos previos para la determinación de bismuto con detección espectrofotométrica

Analito	Reactivo cromogénico	Detección	Técnica en flujo	[Reactivo] (mol L^{-1})	Volumen de reactivo (mL)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisión (RSD, %)	Frecuencia de inyección (h^{-1})	Ref.
Bi	AMT	UV-Vis	SIA	5×10^{-4}	0.15	250	1.1	72	[44]
Bi	XO	UV-Vis Sensor sol-gel	MCFIA	2×10^{-3}	-	7	0.8	42	[137]
B	BFHD	SPE UV-Vis	Manual	2×10^{-3}	1.2	31	1.65	-	[163]
Bi	AMT	UV-Vis	FIA	7.08×10^{-4}	-	150	1.3	-	[165]
Bi	MTB	LWCC UV-Vis	MSFIA	6×10^{-6}	0.5	1.5	0.7	30	Método propuesto

AMT: Azul de metiltimol; XO: Naranja de xilenol; BFHD: 5-(2'-bromofenilazo)-6-hidroxi pirimidina-2,4-diona; UV-Vis: Detección espectrofotométrica

5.3.4 Interferencias

El reactivo cromogénico utilizado (MTB) en este método tiene mayor afinidad por los iones de mayor carga, es decir, por iones con estado de oxidación (III) [166]. El MTB puede formar complejos con varios metales, pero si se toma en cuenta el medio de reacción (medio ácido) y la longitud de onda de absorción máxima para el complejo Bi (III)-MTB, los Al^{3+} y Fe^{3+} son seleccionados como iones interferentes potenciales, ya que éstos producirían una interferencia positiva. Se ha reportado que el ión cloruro (Cl^-) puede producir una interferencia negativa enmascarando el bismuto [136].

Se realizó un estudio de interferencias para los iones interferentes potenciales en la determinación de bismuto, considerando como interferencia una variación de $\pm 10\%$ en la señal analítica.

La concentración de aluminio en aguas de pozo reportada en trabajos anteriores es de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ [167], este valor se utilizó como referencia. Para evaluar los posibles interferentes se prepararon disoluciones en presencia de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de bismuto, y se fueron adicionando cantidades mayores de los iones interferentes. Los iones Al^{3+} y Cl^- no muestran una interferencia significativa en los rangos de concentración $0-1 \text{ mg L}^{-1}$ y $0-60 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

La concentración de hierro en aguas de pozo se encuentra en el rango $1-2 \text{ mg L}^{-1}$ de acuerdo a lo reportado anteriormente [168], este dato fue usado como referencia para evaluar el grado de interferencia de este ion. El ion Fe^{3+} presenta interferencia a $200 \mu\text{g L}^{-1}$, por consecuencia se requiere un agente enmascarante para poder cuantificar el bismuto, y se utilizó $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico, logrando un nivel de tolerancia de hasta 2 mg L^{-1} de Fe^{3+} .

Tabla 8. Evaluación de interferentes en la determinación de bismuto

Interferente	Concentración de Bi (III) inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rango ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Variación de la señal analítica (%)	Nivel de Tolerancia	Observaciones
Al^{3+}	250	0-1000	4	1:4	
Cl^-	250	0-60000	5	1:240	
Fe^{3+}	250	0-2000	50	1:1	
Fe^{3+}	250	0-2000	6	1:8	Agregando EDTA

5.3.5 Validación y aplicación del método propuesto

La validación de este método se llevó a cabo analizando diferentes muestras de referencia (muestras farmacéuticas). Estas muestras fueron analizadas con el método propuesto y con detección ICP-OES, con tres réplicas. La comparación de resultados se realizó a través de la prueba de Fisher de homocedasticidad y la prueba t de comparación de medias para saber si la diferencia era significativa. Los resultados se muestran en la Tabla 9, y como se puede observar, los valores de t obtenidos están por debajo del valor crítico. Además, no se observaron diferencias significativas en un nivel de confianza del 95% entre los resultados encontrados por el método propuesto y los obtenidos por ICP-OES.

Tabla 9. Validación del método propuesto analizando muestras farmacéuticas y la comparación con los resultados del ICP-OES. $F_{crit} = 19$, $t_{crit} = 2.92$ (n=3) nivel de confianza 95%

Concentración de bismuto				Prueba de comparación	
Muestra	Contenido teórico	Método propuesto	ICP-OES	F_{obs}	t_{obs}
Synalar rectal (crema)	25 mg g ⁻¹	25 ± 1 mg g ⁻¹	24 ± 1 mg g ⁻¹	1.00	1.22
Gastrodenol (Tableta)	70 mg g ⁻¹	66 ± 2 mg g ⁻¹	69 ± 5 mg g ⁻¹	6.25	0.96
Labcatal (Disolución líquida inyectable)	35 mg L ⁻¹	34.7 ± 0.2 mg L ⁻¹	34.4 ± 0.4 mg L ⁻¹	4.00	1.16

Los resultados son expresados como ± desviación estándar de tres réplicas

La aplicabilidad del método propuesto fue evaluada analizando 3 muestras de agua de pozo de diferentes localizaciones de Mallorca, España. Como se puede observar en la Tabla 10, se adicionó a las muestras una concentración de 50 µg L⁻¹ de bismuto, lográndose recuperaciones satisfactorias.

Tabla 10. Análisis de agua de pozo con el método propuesto

Muestras de agua			
Muestra	Bismuto adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bismuto encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)
Agua de pozo 1	0	53 ± 5	--
	50	102 ± 8	98.4
Agua de pozo 2	0	59 ± 3	--
	50	105 ± 5	90.1
Agua de pozo 3	0	51 ± 4	--
	50	99 ± 2	94.9

Los resultados son expresados como \pm desviación estándar de tres réplicas

5.4 Conclusiones

Se desarrolló un nuevo analizador de bajo costo y miniaturizado para la determinación de bismuto explotando la técnica de análisis en flujo por inyección multijeringa acoplada a la celda de flujo de largo paso óptico.

El bismuto fue determinado espectrofotométricamente usando un reactivo cromogénico con resultados satisfactorios. La automatización del sistema propuesto con la técnica MSFIA proporciona una disminución del consumo de reactivos, haciendo de esta metodología una opción más económica y amigable con el medio ambiente en comparación con trabajos realizados previamente para la determinación de bismuto en muestras ambientales y farmacéuticas.

Una de las principales ventajas del método automatizado desarrollado es la miniaturización lograda, la cual permite la utilización del método con propósitos para monitoreo “in situ” y mediciones en campo. La aplicabilidad del método desarrollado como analizador de bismuto en muestra de agua de pozo, ha sido validada por los buenos resultados obtenidos en la prueba de adición-recuperación. Además, el método fue validado con éxito utilizando muestras de referencia (farmacéuticas). El sistema constituye una herramienta potencial, simple y de bajo costo para la determinación de bismuto.

CAPÍTULO 6

Método automatizado basado en la aplicación de un dispositivo impreso 3D para la extracción, especiación y determinación de hierro (III)

6.1 Resumen

El desarrollo del proceso aditivo capa por capa (Impresión 3D) ha permitido la obtención de dispositivos con diseños complejos fabricados con gran simplicidad y de bajo coste. En este trabajo se presenta un dispositivo impreso 3D con características integradas para la mejora de la interacción entre líquidos, con el propósito de aumentar el rendimiento de las reacciones. Lo anterior se logra con el diseño de mezcladores basados en cubos interconectados integrados en un dispositivo impreso 3D, que consta de 2 partes que se pueden ensamblar mediante roscado, y que a su vez contiene un soporte para disco adsorbente.

El diseño del dispositivo, obtenido través de un programa de diseño computacional, se logra fabricar con la impresión 3D utilizando la técnica SLA. Este dispositivo impreso 3D se ha acoplado con la técnica MSFIA para desarrollar un sistema en flujo para la especiación, preconcentración y determinación de Fe. Con este acoplamiento en combinación con un espectrofotómetro miniaturizado, se ha logrado desarrollar un analizador de Fe de menor tamaño con mejores características analíticas en comparación con métodos más convencionales

En este capítulo se describe el desarrollo e implementación de un método totalmente automatizado para la determinación de Fe evaluado a través del análisis de muestras de agua. Dentro de un solo dispositivo se han llevado a cabo 3 procesos químicos: oxidación, extracción y determinación de Fe. Para el análisis de las muestras, la oxidación de Fe (II) a Fe (III) se ha llevado a cabo usando peróxido de hidrógeno, la SPE de Fe (III) usando un disco quelante y la reacción cromogénica basada en el uso de tiocianato de amonio.

Los valores de los parámetros analíticos más relevantes son el límite de detección de 6.7 ng para Fe total. Además, se ha obtenido una precisión intra-día de 4% ($n = 12$) y una precisión inter-día de 4.3% ($n = 5$, diferentes días y discos quelantes), ambos valores expresados como desviación estándar relativa (RSD).

El método desarrollado ha sido validado utilizando un material de referencia certificado, a través de comparación de resultados analizando las muestras con ICP-OES y con el método adición-recuperación. La combinación de los dispositivos impresos 3D integrados con técnicas automáticas basadas en flujo ha mostrado características analíticas mejoradas en comparación con la construcción de manifolds a partir politetrafluoroetileno convencionales.

A continuación se presenta la descripción del trabajo realizado para obtener el método para la determinación de Fe utilizando un dispositivo impreso 3D.

6.2 Experimental

6.2.1 Reactivos

Todas las disoluciones fueron preparadas con reactivos de grado analítico y agua calidad Millipore. Los estándares de Fe fueron preparados a partir de una disolución inicial de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ Fe (II), o Fe (III), las alícuotas a utilizar de la disolución inicial se pusieron en un buffer ($\text{pH} = 2.5$). Las disoluciones iniciales (1000 mL) fueron preparadas a partir de sulfato amónico férrico dodecahidratado, o sulfato amónico ferroso hexahidratado (Scharlau) conteniendo 10 mL de ácido clorhídrico 37% y 5.5 mL de ácido sulfúrico 96% (Scharlau). Para llevar a cabo la preconcentración se requiere una disolución de ácido fórmico 0.1 mol L^{-1} (95%, Sigma Aldrich) como buffer en las disoluciones estándar y las muestras.

Otros reactivos utilizados para la determinación de Fe son el peróxido de hidrógeno, cloruro de sodio y tiocianato de amonio (Scharlau). El estudio de posibles interferentes requirió los siguientes reactivos: carbonato anhidro de sodio (Scharlau), sulfato anhidro de sodio (Scharlau), nitrato de sodio (Riedel de Haën) y disoluciones estándar de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobalto (II), cobre (II), plomo (II), níquel (II), manganeso (II), cromo (III), aluminio (III) y cadmio (II) (Scharlau).

Los dispositivos impresos requieren limpieza, para ello se utilizó alcohol isopropílico (Scharlau) para eliminar los monómeros remanentes que no se polimerizaron durante la impresión.

6.2.2 Diseño del dispositivo impreso 3D

Para demostrar el potencial de la impresión 3D a través de la técnica SLA considerada de bajo costo, se construyeron dispositivos SPE con características integradas. Se propuso un diseño de dos componentes para llevar a cabo la especiación, la SPE y la formación del complejo del analito de interés en un solo dispositivo (Figura 14). La parte 1 integra un

punto de confluencia (muestra-oxidante) y un mezclador donde se llevará a cabo la oxidación de Fe (II) a Fe (III) previo a la preconcentración, después del mezclador se incluye un segundo punto de confluencia para introducir el eluyente al dispositivo. La parte 2 contiene un soporte para el disco adsorbente, un punto de confluencia para adición del reactivo cromogénico, y un mezclador para que se lleve a cabo la reacción colorimétrica, previo a la detección espectrofotométrica.

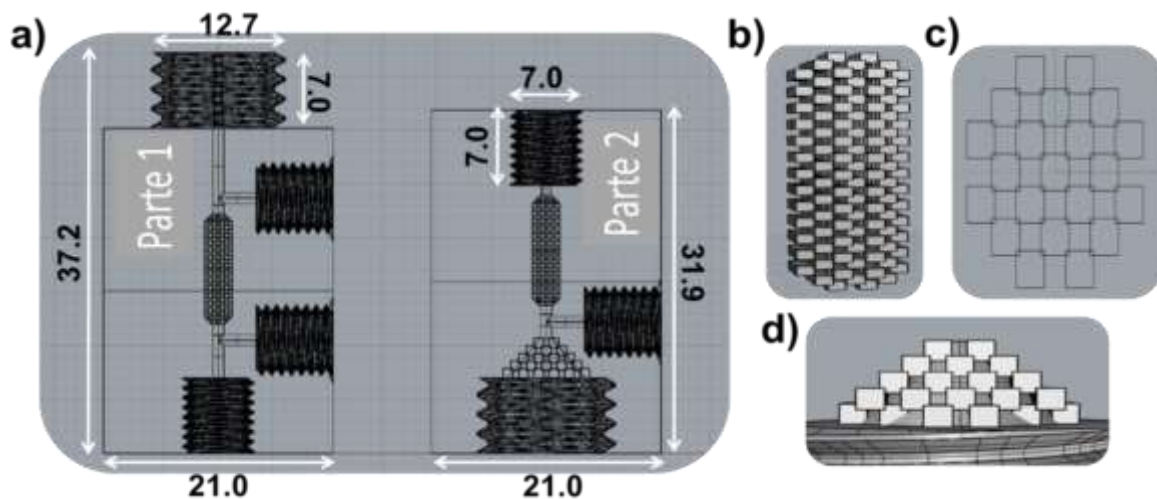


Figura 14. Representación del dispositivo impreso 3D para SPE. a) Partes del dispositivo de extracción, dimensiones en mm. b) Mezcladores presentes en ambas partes del dispositivo. c) Capa de cubos de un mezclador. d) Diseño del soporte de disco adsorbente basado en un cono truncado

Los mezcladores se diseñaron basándose en estructuras de cubos pequeños, que a su vez configuran redes interconectadas, con el propósito de generar un flujo turbulento para mejorar la interacción entre los fluidos. El soporte del disco adsorbente también se diseña en una estructura de cubos interconectados que tienen como base un cono truncado, este diseño se utiliza para mejorar el flujo dentro del dispositivo y evitar sobrepresión. Ambas partes del dispositivo se muestran en la Figura 14a, mientras que en la Figura 14b se muestra la matriz de cubos interconectados (mezcladores) usada en ambas partes del dispositivo, en la Figura 14c y Figura 14d se muestran los detalles geométricos del soporte del disco adsorbente.

El dispositivo impreso 3D fue diseñado a través del programa informático Rhinoceros 5 R11 32 (McNeel& Associates, EUA) e impreso por el programa Preform

(Formlabs), utilizando un formato .STL para el intercambio de datos del diseño. Los monómeros sin reaccionar de los canales de flujo del dispositivo impreso 3D son eliminados bombeando alcohol isopropílico usando una bomba de HPLC (Waters, Milford, EUA). Después de la impresión, los componentes del dispositivo son secados a temperatura ambiente durante 15 min y curados en una cámara ultravioleta CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP, Upland, Canadá) entre 8 -10 h, usando una lámpara ultravioleta con una longitud de onda de 365 nm. Para la impresión de los dispositivos se utilizó una resina fotoactiva transparente (Formlabs), que está compuesta por monómeros y oligómeros de metacrilato, además contiene un iniciador con el objetivo de que se realice la adecuada polimerización de la resina. No consta la composición real de los componentes debido a que es una resina comercial.

Los parámetros de impresión dependerán del tipo de diseño, en este caso se tienen características integradas, por lo cual se seleccionó como resolución para la impresión 0.05 mm. Respecto al tiempo de impresión, éste dependerá de la cantidad de piezas (1 pieza- 120 min; 2 piezas- 156 min; 4 piezas- 204 min). Los dispositivos fueron impresos en posición vertical y sin soportes, tomando en cuenta esta posición se tienen 744 capas para imprimir. Una vez realizada la impresión y la limpieza del dispositivo, el peso del dispositivo es de 24 g y el costo de la tinta consumida es aproximadamente US\$ 3.75.

Los mezcladores están compuestos por una matriz de cubos con las siguientes dimensiones: 1.22 mm de longitud x 2.1 mm de ancho, el tamaño de cada cubo es 0.04 mm de lado y la separación entre cada cubo es de 0.3 mm; la superposición de los cubos es de 0.05 mm. El soporte del disco adsorbente se basa en una matriz de cubos interconectados sobre un cono truncado, estos componentes tienen las siguientes dimensiones: cono truncado de 1 mm x 7 mm x 3.7 mm (diámetro inferior x diámetro superior x altura) con cubos de 0.9 mm x 0.5 mm x 0.2 mm (lado x separación x superposición).

Las dimensiones de las roscas para los conectores de las tuberías son 7 mm x 7 mm (diámetro x longitud) y las dimensiones de las roscas de las partes principales del dispositivo son: para la parte 1 son 30.2 mm + 7 mm x 12.69 mm x 21 mm (longitud + longitud de la rosca x diámetro de la rosca x ancho) y la parte 2 tiene 31.9 mm x 21 mm (longitud x ancho). Los canales de flujo del dispositivo tienen un diámetro interno de 1 mm.

6.2.3 Manifold e instrumentos

El dispositivo impreso 3D para SPE fue implementado en un sistema MSFIA con detección espectrofotométrica (Figura 15). El sistema propuesto está basado en una bureta multijeringa con un motor de 5000 pasos (BU 4S, Crison, España), la bureta utilizada para el método desarrollado contaba con 4 jeringas de vidrio para direccionar los líquidos: de 10 mL (S1), 5 mL (S2-S3) y 2.5 mL (S4), (Hamilton, Suiza). Se utilizó una válvula solenoide de tres vías (V5) (Tasakago Electric Inc., Japón) adicional para cargar la muestra. Las conexiones desde MSFIA hacia el dispositivo impreso 3D fueron construidas con tubería de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.8 mm de diámetro interno. Para la carga de muestra se utilizó un bucle de carga (HC) de PTFE con un volumen de 10 mL, con diámetro interno de 1.5 mm, este bucle conecta V5 con S1.

El sistema de detección está basado en un espectrofotómetro CCD portátil USB 2000 (Ocean Optics, EUA), como fuente de luz un LED color blanco y una celda de flujo (Starna, Hainault, Gran Bretaña) con trayectoria óptica de 10 mm. La señal analítica se registró a 480 nm, utilizando una longitud de onda de corrección de 700 nm. Se utilizó el programa AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems, Bunyola, España) para el control instrumental, la adquisición y el procesamiento de datos.

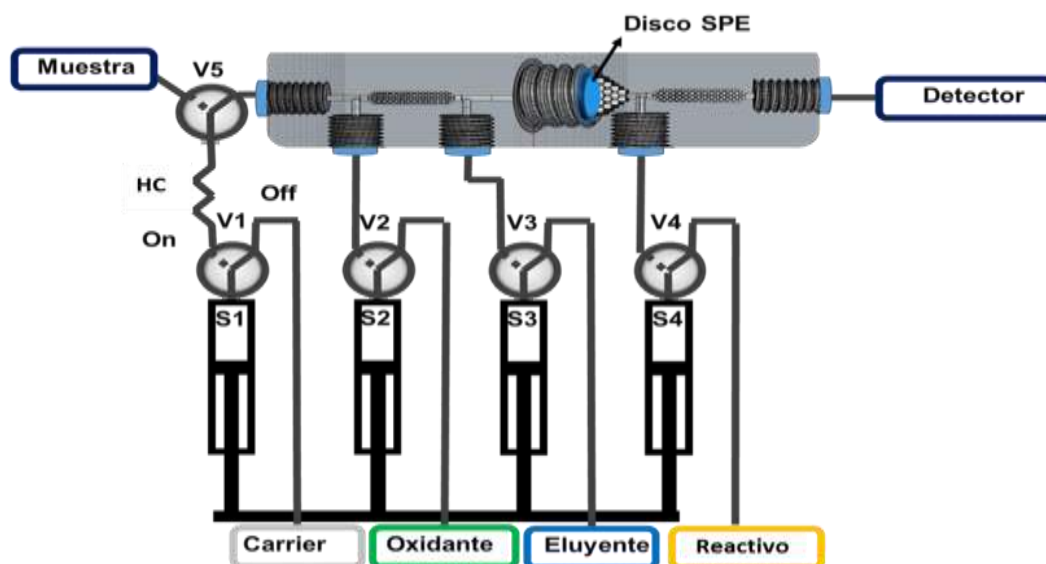


Figura 15. Configuración MSFIA con un dispositivo SPE impreso 3D, utilizando un disco adsorbente para la preconcentración y determinación de Fe. V1-V5: Válvulas solenoides de tres vías, S1-S4: Jeringas; HC: Bucle de carga

Para la validación de la metodología propuesta a través de comparación entre técnicas, se utilizó un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Optima 5300V, Perkin Elmer). Para conocer la composición del material impreso se utilizó un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), el instrumento utilizado fue un Bruker Tensor 27 FT-IR con una resolución de 3 cm^{-1} .

6.2.4 Procedimiento analítico

La secuencia operativa para la determinación de Fe total se encuentra descrita en la Tabla 11 y se resume a continuación: la muestra es introducida al sistema utilizando el bucle de carga ubicado entre V1 y V5, ambas válvulas en posición “on”. A continuación, la muestra es enviada al dispositivo impreso 3D activando V1 en posición “on”, a su vez también se activa V2 en la misma posición logrando la mezcla de la muestra con el peróxido de hidrógeno (S2) para llevar a cabo la oxidación de Fe (II) a Fe (III). Consecutivamente el producto de la oxidación fluye a través del disco adsorbente, obteniéndose la retención del analito.

En el siguiente paso, el detector espectrofotométrico inicia la adquisición de datos. El siguiente paso es la introducción del eluyente al sistema, el cual es una disolución de ácido clorhídrico (S3). Para ello se activa V3 en posición “on” y conjuntamente se activa V4 en la misma posición para introducir el complejante (tiocianato de amonio, S1), logrando la desorción del analito y la consecutiva reacción colorimétrica en el mezclador; el producto de la reacción se envía al detector utilizando el carrier (disolución de NaCl, S1) activando V1 en “on”. Con este paso también se logra el lavado del disco adsorbente. Para la determinación de Fe (III) se ejecuta el mismo procedimiento, con diferencia que S2 se coloca en posición “Off” en el paso número 2 (se introduce el oxidante al sistema).

Tabla 11. Resumen del procedimiento analítico para la especiación y determinación de Fe por el método propuesto

Paso	Instrucción	Posición de válvulas					Volumen (mL)	Caudal (mL min ⁻¹)	
		V1	V2	V3	V4	V5			
1	Cargando muestra	Aspirar	On	Off	Off	Off	On	3	3
2	Oxidación y SPE	Dispensar	On	On	Off	Off	Off	4	2
3	Inicio de adquisición de datos						-		
4	Elución	Dispensar	Off	Off	On	On	Off	1.5	2
5	Inyección de carrier	Dispensar	On	Off	Off	Off	Off	1	2
6	Se detiene el detector								

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Configuraciones del dispositivo impreso 3D

Las condiciones experimentales iniciales para la determinación de Fe total se establecieron en referencia a las propuestas por C. Pons, et al.[141]. Los discos quelantes (3M Empore) se utilizan como material adsorbente para la retención del analito. El diámetro del disco adsorbente seleccionado es de 10 mm, establecido por las dimensiones del soporte diseñado en el dispositivo impreso 3D. El carrier (S2) utilizado para este método es una disolución de NaCl 2 mol L⁻¹, el efecto del carrier fue estudiado en el trabajo antes mencionado. El pH de la muestra y de las disoluciones estándar fue ajustado a 2.5, utilizando una disolución de ácido fórmico 1 mol L⁻¹ con la finalidad de tener el medio adecuado para lograr el mejor rendimiento de la preconcentración. Para asegurar la oxidación de Fe (II) a Fe (III) se utiliza una concentración de 0.025 mol L⁻¹ H₂O₂, debido a que se obtuvieron pendientes idénticas en las curvas de calibración tanto para Fe (III) como para Fe total. Las disoluciones estándar para la determinación de Fe total contenían la misma cantidad de Fe (II) y Fe (III).

La configuración del dispositivo impreso 3D se evaluó con 5 diferentes combinaciones (Figura 16). Se iniciaron las pruebas evaluando un dispositivo que incluye un soporte de disco básico (SD) sin características integradas, este dispositivo fue

impreso 3D para fines de comparación. El soporte básico es similar al soporte de disco micro-mecanizado utilizado en trabajos previos [141]. La configuración 1 (C1) contiene 3 puntos de confluencia integrados para oxidante, eluyente y reactivo complejante, pero sin mezcladores integrados de matriz cúbica para mejorar la mezcla. La segunda configuración (C2) contiene un mezclador integrado en la parte 2 del dispositivo, con la finalidad de mejorar la reacción colorimétrica post-SPE. La tercera configuración (C3) contiene un mezclador de matriz de cubos en la parte 1 del dispositivo, con el propósito de mejorar la mezcla de la muestra con el oxidante. Y finalmente, la cuarta configuración (C4) contiene mezcladores en ambas partes del dispositivo.

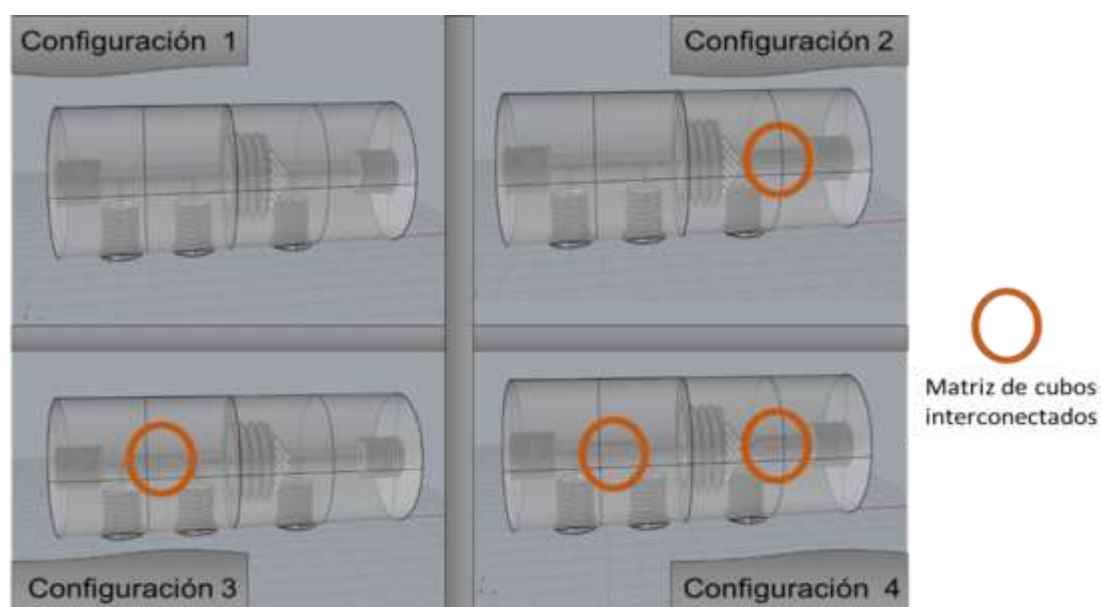


Figura 16. Configuraciones evaluadas para el dispositivo impreso 3D para la determinación de Fe

En los experimentos para la determinación de Fe (III) se utilizó un volumen de muestra de 3 mL de una disolución estándar de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ Fe (III). En cambio, para la determinación de Fe total se emplearon 3 mL de una disolución estándar de Fe total [$100 \mu\text{g L}^{-1}$ Fe (III) + $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Fe (II)]. Los resultados para la determinación de Fe (III) y Fe total utilizando las diferentes configuraciones se pueden observar en la Figura 17. Los resultados obtenidos usando dispositivos impresos 3D que se diseñaron para esta etapa, se compararon con sistemas en flujo similares hechos con elementos tradicionalmente utilizados, como bucles de reacción basados en tubería de PTFE. La configuración

evaluada con elementos tradicionales está basada en tres conectores tipo T, uno para mezclar la muestra con el oxidante, otro para adicionar el eluyente entre el bucle de oxidación y el soporte para disco SPE (SD) y el tercero para introducir el reactivo complejante. Adicionalmente, se utilizan dos bucles de reacción de (longitud 7 cm; 0.8 mm i.d.), uno para la reacción de oxidación colocado entre los conectores 1-2 y otro para la reacción colorimétrica ubicado entre el conector 3 y el detector.

Como se muestra en la Figura 17, al integrar los puntos de confluencia dentro del dispositivo impreso 3D (C1), se obtiene una ligera mejora de la lectura de la señal analítica en comparación con sistemas en flujo con elementos tradicionales (SD). La altura de la señal analítica del complejo mejora gradualmente al incorporar los dos mezcladores basados en una matriz de cubos interconectados. Además, al aumentar el número de elementos integrados dentro del dispositivo impreso 3D se observa un aumento en la sensibilidad del método propuesto.

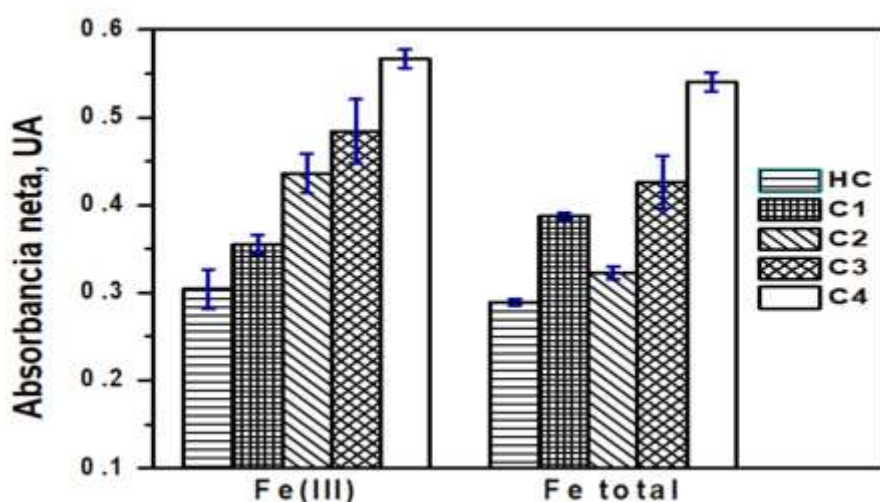


Figura 17. Comparación entre 5 diferentes configuraciones con dispositivos impresos 3D para la determinación de Fe

6.3.2 Composición del dispositivo impreso 3D

La resina utilizada para imprimir los dispositivos en este trabajo tiene una composición de monómeros y oligómeros de metacrilato. La espectroscopia FT-IR fue usada para el estudio de la composición del material resultado de la impresión 3D (Figura 18). Una

banda ancha se observa en 3305 cm^{-1} , la cual es atribuida al estiramiento simétrico o tensión del enlace O-H. Las bandas observadas a 2854 cm^{-1} y 3305 cm^{-1} son atribuidas al estiramiento simétrico o tensión del enlace C-H. Además, se observó una banda a 1699 cm^{-1} , esta banda es atribuida al estiramiento simétrico o tensión del enlace C=O. También se encontraron otras bandas a 1535 , 1240 y 1130 cm^{-1} , las cuales aparecen debido a la tensión o estiramiento simétrico de los enlaces C=C y C-O.

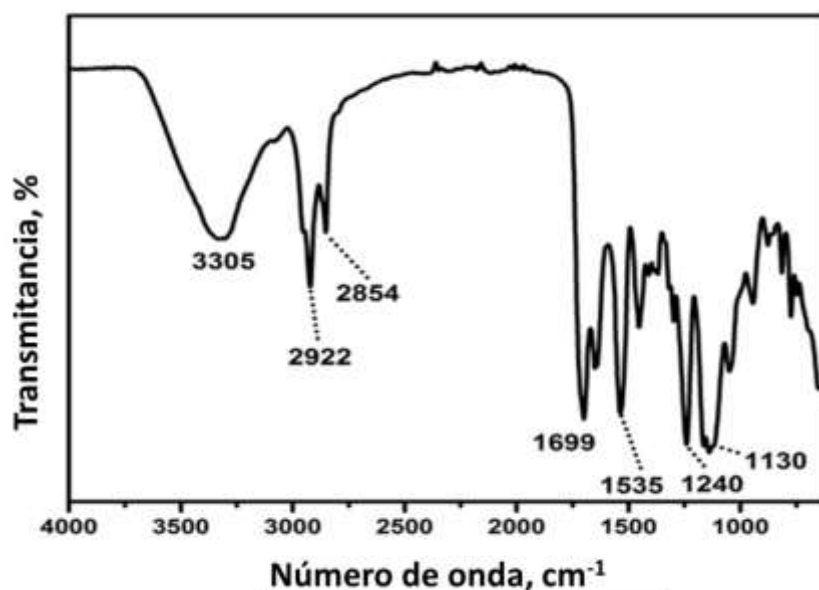


Figura 18. Espectro infrarrojo del material impreso 3D a través de FT-IR

Debido a la posible extracción de iones por parte del material, como propiedad intrínseca, se evaluó el efecto del material polimérico del dispositivo impreso 3D. La extracción de los analitos se puede presentar debido a los grupos funcionales presentes en la resina comercial utilizada, y que a su vez brindan la capacidad para actuar como intercambiador de cationes débiles [169]. Para medir el efecto de la posible retención de Fe por parte del material impreso, se realizó la determinación de Fe total utilizando el dispositivo impreso 3D (Configuración 4, C4) en ausencia del disco quelante. Los resultados obtenidos demuestran que no se detectaron señales analíticas, en este experimento se realizaron 3 diferentes réplicas usando una concentración de $200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de Fe total. Por lo anterior, se concluyó que la retención de Fe sobre el material impreso 3D era despreciable.

6.3.3 Optimización de variables de la especiación y preconcentración de Fe

El estudio de las variables experimentales que afectan la señal analítica se llevó a cabo a través de análisis univariante debido a que en trabajos previos ya se ha analizado el comportamiento del método químico [141]. Los caudales para la extracción y elución, la concentración del reactivo complejante y del eluyente, además del volumen de eluyente, son las variables seleccionadas para obtener las mejores condiciones en la determinación de Fe utilizando el dispositivo impreso 3D desarrollado (Configuración 4, C4). Para estos experimentos se utilizó un volumen de muestra de 3 mL de una disolución estándar de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ Fe total ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada catión).

El efecto de los caudales para la preconcentración y elución fueron evaluados en el rango de 1 a 2.6 mL min^{-1} . El límite inferior (1 mL min^{-1}) del rango estudiado se estableció en base al caudal mínimo que se puede realizar con la bureta utilizada y una jeringa de 10 mL. En cambio, el caudal máximo establecido es de 2.6 mL min^{-1} , debido a la sobrepresión generada dentro del sistema en flujo con valores de caudal mayores. En el caso del caudal en la preconcentración, la señal analítica decrece conforme se incrementa el caudal, causado principalmente por la disminución de transferencia de masa del analito desde la disolución estándar al disco adsorbente (Figura 19).

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó un caudal para la preconcentración de 2 mL min^{-1} para estudios posteriores, ya que se encontró un compromiso entre una alta sensibilidad y precisión, así como una buena frecuencia de análisis. El análisis del caudal del eluyente se considera de suma importancia, porque con esta variable se asegura la desorción apropiada del analito y un adecuado rendimiento de la reacción colorimétrica para la cuantificación de Fe. El efecto del caudal de la elución permaneció constante en el intervalo estudiado (1 mL min^{-1} a 2 mL min^{-1} , Figura 19). Se observó un descenso en el valor de la señal analítica utilizando caudales mayores, por lo tanto se seleccionó 2 mL min^{-1} como el caudal para estudios posteriores.

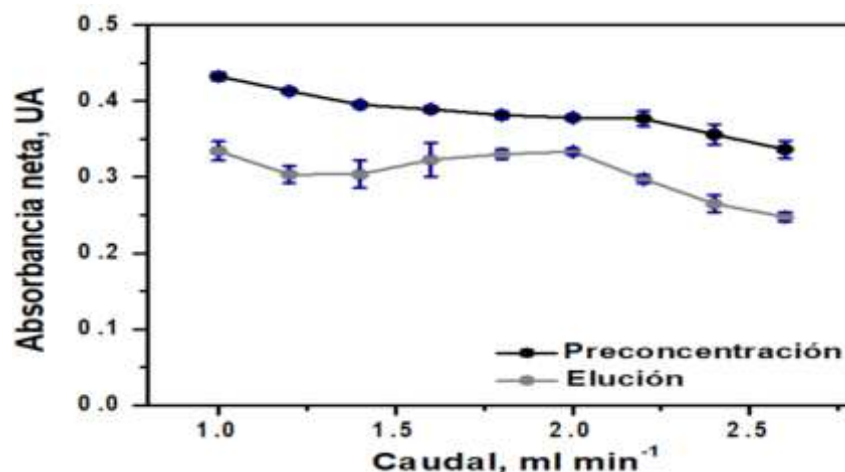


Figura 19. Optimización del caudal de preconcentración y elución

En el caso de la variable concentración del eluyente, la señal analítica máxima se alcanza utilizando 2 mol L^{-1} (Figura 20). Como se muestra en la Figura 20, al aumentar la concentración del reactivo complejante se tiene un efecto positivo sobre la altura del pico de la señal analítica del complejo formado. Esta variable fue evaluada en el rango de 0.5 a 5 mol L^{-1} de NH_4SCN , seleccionando como concentración óptima 1.25 mol L^{-1} , porque utilizando esta concentración se obtiene una buena relación entre la señal del complejo respecto a la señal del blanco, y a su vez, se obtienen valores menores en la desviación estándar.

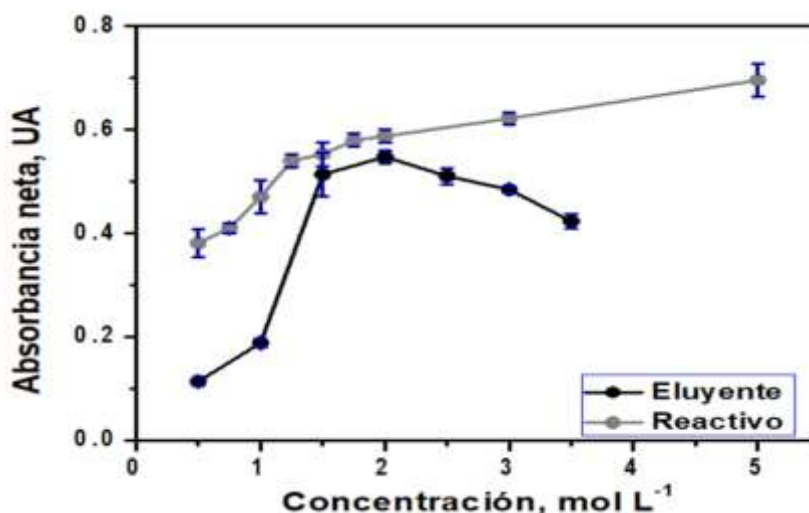


Figura 20. Optimización de la concentración del reactivo complejante y eluyente

El volumen de eluyente se estudió en el rango de 0.5 a 3.5 mL (Figura 21). Para asegurar la desorción del analito del disco adsorbente, se utilizan 0.5 mL de eluyente como límite inferior. La mayor señal analítica obtenida se observa con un volumen de eluyente de 1.5 mL, por lo tanto este volumen fue seleccionado para los experimentos posteriores.

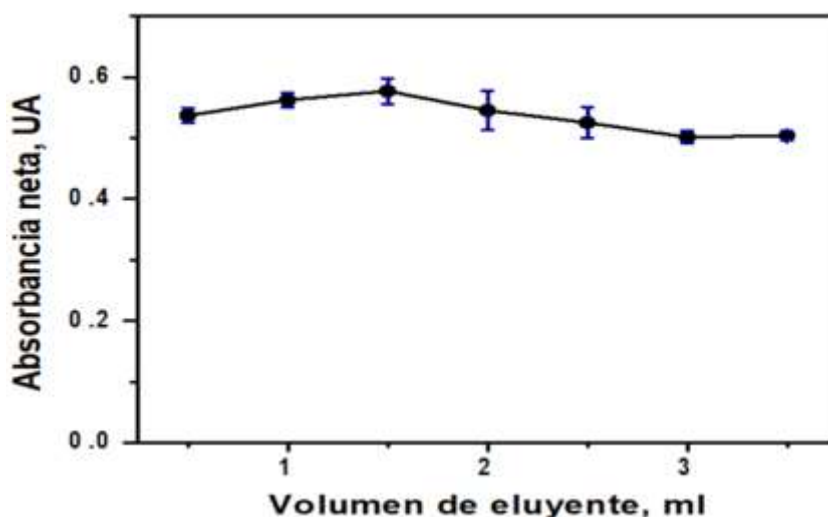


Figura 21. Optimización del volumen de eluyente

6.3.4 Parámetros analíticos

Trabajando con las condiciones experimentales optimizadas, se procedió a establecer los parámetros analíticos para la determinación de Fe (III) y Fe total (Tabla 12). Las curvas de calibración para la determinación de Fe (III) y Fe total son: $y = 0.0009 (\text{ng Fe}^{3+}) - 0.028$ ($R^2 = 0.999$, $n = 9$), e $y = 0.0008 (\text{ng Fe}) + 0.007$ ($R^2 = 0.999$, $n = 9$), respectivamente. En la calibración másica se obtiene una preconcentración lineal hasta un volumen de 24 mL a un nivel de concentración de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe total.

El rango lineal de trabajo para Fe total fue establecido de 22 ng a 2400 ng y para Fe (III) fue de 21 ng a 2400 ng, los límites de detección para ambos fue de 7 ng. Los límites de detección obtenidos son aproximadamente 2 veces menores respecto a los obtenidos por otros sistemas SPE automatizados, usando discos quelantes y sistemas en flujo basados en redes de tuberías tradicionales [141,145].

Tabla 12. Parámetros analíticos para la especiación, extracción y determinación de Fe a través del método propuesto

Parámetros analíticos	Fe (III)	Fe total
Límite de detección (ng)	7	7
Límite de cuantificación (ng)	21	22
Rango lineal de trabajo (ng)	21-2400	22-2400
Sensibilidad (UA/ng)	0.0009	0.0008
Precisión intra-día (% , n= 12)	3.8*/2.8**	4*/2.4**
Precisión inter-día(% , n= 5)	3.6	4.3
Frecuencia de análisis (h⁻¹)	15	
Durabilidad del disco (inyecciones)	100	
*Nivel menor (50 µg L ⁻¹) **Nivel mayor (200 µg L ⁻¹)		

La precisión intra-día (repetitividad) fue evaluada como desviación estándar relativa (RSD) a dos diferentes niveles de concentración (50 µg L⁻¹ y 200 µg L⁻¹) para 12 inyecciones consecutivas. En cambio, la precisión inter-día (reproducibilidad) fue calculada empleando señales obtenidas utilizando 5 diferentes discos en 5 diferentes días (n=5). En la determinación de Fe (III), la precisión intra-día fue de 3.8% (nivel menor) y 2.8% (nivel mayor). En el caso de la determinación de Fe total, los valores obtenidos fueron de 4.0% (nivel menor) y 2.4% (nivel mayor). La precisión inter-día fue de 3.6% para Fe (III) y 4.3 % para Fe total (nivel: 200 µg L⁻¹). La precisión obtenida utilizando la combinación de MSFIA con el dispositivo impreso 3D (configuración 4, C4) es similar a las obtenidas en trabajos previos [141,145,170].

La frecuencia de análisis del método propuesto para la determinación de Fe, usando un volumen de muestra de 3 mL, fue de 15 h⁻¹. Se realizó el estudio de la vida media del disco quelante para la preconcentración de Fe total (3 mL, 200 µg L⁻¹); para ello se realizaron 100 inyecciones consecutivas, las cuales se pueden observar en la Figura 22, lográndose recuperaciones superiores al 95%.

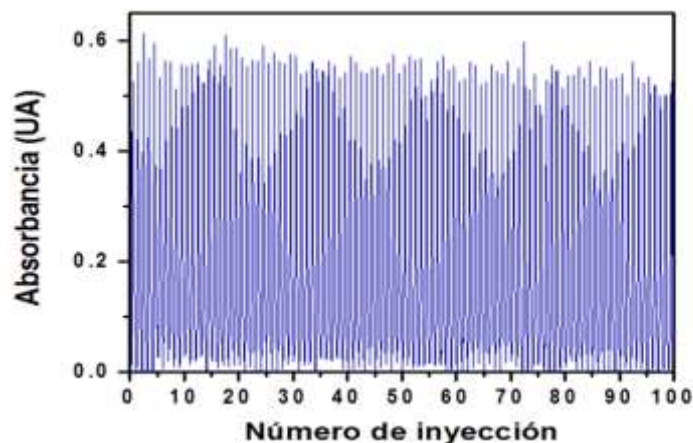


Figura 22. Durabilidad del disco para la determinación de Fe total de 100 inyecciones consecutivas. Volumen de muestra: 3 mL; concentración de Fe total: 200 $\mu\text{g L}^{-1}$

6.3.5 Interferencias

Se evaluó el efecto de iones interferentes en la determinación de Fe, estableciendo la relación de tolerancia al añadir determinada concentración del ion interferente; el criterio establecido es que la variación de la señal analítica debe encontrarse dentro del intervalo $\pm 10\%$. Las condiciones de este estudio son las siguientes: volumen de muestra 3 mL y concentración de disolución estándar de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Fe total. Los iones considerados para este estudio como potenciales interferentes fueron los iones que comúnmente están presentes en muestras de agua, además de considerar los iones que pudiesen ser retenidos por el disco quelante (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+}).

En el caso de Cu^{2+} , se presenta una interferencia positiva en una relación de tolerancia de 10:1 respecto a la concentración del analito. En cambio, el nivel de tolerancia para el Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} y Al^{3+} fue de 100:1. Los iones Mn^{2+} , Ni^{2+} y Cr^{3+} no mostraron una interferencia significativa hasta el nivel de tolerancia de 1000:1.

En referente a los aniones comúnmente presentes en muestras de agua, como el sulfato, nitrato, cloruro y carbonato, no presentaron interferencia significativa al nivel de 5000:1. Después del análisis de interferencias se puede concluir que la determinación de Fe en muestras de agua se puede cuantificar de manera satisfactoria, ya que la proporción de Fe en las muestras es mayor respecto a los iones que pudiesen presentar interferencia,

como es el caso del Cu^{2+} , por lo que no se podría afectar la señal analítica por parte de los iones analizados en la determinación de Fe.

6.3.6 Validación y aplicación del método propuesto

En esta sección se describe la validación y aplicación del método propuesto a muestras de agua, que se llevó a cabo en tres etapas: en la primera se realizó la validación a través del análisis de materiales de referencia certificados (CRM), en la segunda etapa se validó por comparación entre técnicas de detección y en la tercera se hizo por el método de adición-recuperación.

Para la etapa de validación del método se utilizaron dos materiales de referencia certificados, una muestra de agua de río SLRS-4 (Institute for National Measurement Standard) y una muestra de agua residual SPS-WW2 bath 106 (National Institute of Standard and Technology). Las muestras utilizadas en esta etapa fueron llevadas a un medio ácido (pH 2.5). Los valores certificados para las muestras de agua de río y residual para Fe total son $103 \pm 5 \mu\text{g L}^{-1}$ y $5000 \pm 25 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Se realizaron 3 réplicas para cada una de las muestras y se utilizó un volumen de muestra de 3 mL. En la Tabla 13 se pueden observar los resultados obtenidos para la determinación de Fe total. Los valores obtenidos fueron: $105.1 \pm 6 \mu\text{g L}^{-1}$ para agua de río y $5210 \pm 129 \mu\text{g L}^{-1}$ para la muestra certificada de agua residual. Los resultados de las muestras analizadas a través del método propuesto no presentaron una diferencia significativa a un 95% de nivel de confianza respecto a los valores del material de referencia certificado.

En la etapa de comparación entre técnicas se utilizaron dos tipos de muestras: dos muestras de agua de pozo y dos muestras de lixiviados. Las muestras de agua de pozo fueron tomadas en dos diferentes localizaciones de Mallorca, España, estas muestras se ajustaron a un pH de 2.5 para poder ser analizadas. Las muestras de lixiviados fueron tomadas de una planta de tratamiento de residuos sólidos en Mallorca, España, estas muestras requirieron un proceso de filtrado previo, para esto se utilizó un filtro de nylon de $0.45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. Además, también los lixiviados fueron ajustados a un medio ácido necesario para la preconcentración del analito. Para realizar la comparación entre técnicas, se seleccionó al ICP-OES como técnica alternativa, por lo tanto se analizaron las muestras a través de esta técnica con tres réplicas. En la Tabla 13 se muestran los resultados, y se comprueba que no hay diferencias significativas entre las

muestras analizadas con las dos diferentes técnicas, utilizando un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 13. Validación y aplicación del método propuesto analizando muestras de agua

Muestra	Valor certificado*	Método propuesto*	Muestra	ICP-OES*	Método propuesto*
Agua de río	103 ± 5	105 ± 6	Agua de pozo 1	35 ± 1	38 ± 3
Agua residual	5000 ± 25	5210 ± 129	Agua de pozo 2	354 ± 7	361 ± 8
			Lixiviado 1	133 ± 1	132 ± 10
			Lixiviado 2	527 ± 4	516 ± 22

*Concentración de Fe en $\mu\text{g L}^{-1}$; Los resultados son expresados como \pm desviación estándar de tres réplicas

El método de adición-recuperación para las muestras de agua se llevó a cabo con una muestra de agua de pozo (Agua de pozo 1), para ello se decidió utilizar la especiación del Fe para observar el comportamiento de este proceso en la determinación y preconcentración de Fe dentro de una muestra de agua. La especiación fue evaluada a través de la adición de diferentes cantidades de Fe (II) y Fe (III) en la muestra de agua de pozo 1. Los resultados fueron analizados a través de las señales analíticas obtenidas de la determinación de Fe total y Fe (III). Cada muestra fue analizada directamente, después de agregar diferentes concentraciones de Fe (II) y Fe (III), pero cumpliendo como condición tener una concentración total de Fe de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ en la muestra. En todos los casos, se encontraron recuperaciones satisfactorias para Fe total y Fe (III) que van desde 95 al 103% (Ver Tabla 14).

Tabla 14. Método de adición-recuperación para la muestra de agua de pozo 1

Fe conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Obtenido ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperación (%)	
	Fe (II)	Fe (III)	Fe total	Fe (III)	Fe total	Fe (III)
38 ± 2	0	200	245 ± 3	242 ± 2	103	102
-	200	0	228 ± 9	37 ± 6	96	97
-	100	100	232 ± 3	137 ± 8	97	99
-	150	50	229 ± 9	90 ± 5	96	102
-	50	150	233 ± 9	187 ± 9	97	99

Los resultados son expresados como \pm desviación estándar de tres réplicas

6.4 Conclusiones

En este trabajo se diseñó y fabricó un dispositivo modular impreso 3D con características integradas usando la técnica estereolitografía (SLA). Dentro del dispositivo desarrollado, se llevan a cabo tres diferentes procesos, la oxidación, la SPE y la derivatización del analito.

La implementación del dispositivo impreso 3D en combinación con MSFIA, como técnica de análisis en flujo, permite obtener un sistema totalmente automatizado para la preconcentración, especiación y determinación de Fe. El dispositivo impreso 3D reemplaza a las redes de tuberías y accesorios tradicionalmente usados en análisis en flujo, esto se concluye debido a la obtención de mejores rendimientos en la determinación del analito. El dispositivo impreso 3D desarrollado es muy robusto y se ajusta a las necesidades de aplicación en muestras reales, así como se muestra en la determinación de Fe en muestras certificadas o analizadas con otras técnicas, como ICP-OES.

Los dispositivos impresos 3D con estructuras complejas integradas son un avance hacia mejoras en la reproducibilidad, lo que se atribuye a su implementación en sistemas en flujo, que hacen posible la automatización en el análisis químico. Los nuevos diseños para dispositivos impresos 3D aplicados en la preparación de muestras, con estructuras incluidas dentro del dispositivo, pueden ser diseñados e impresos, o en su defecto compartidos entre diferentes laboratorios utilizando el formato *.STL. Además, el desarrollo de nuevos materiales para la impresión 3D podría conducir al progreso en la aplicación de nuevos dispositivos impresos 3D, de particular interés en el campo de la química analítica.

CAPÍTULO 7

Preconcentración de cromo (VI) utilizando un dispositivo impreso 3D para su evaluación con el uso de disolventes orgánicos

7.1 Resumen

Se ha tratado de reducir el uso de disolventes orgánicos siguiendo los principios de la química verde, pero en algunos métodos químicos se siguen utilizando debido a su eficiencia como eluyentes en la SPE, por lo cual se ha buscado reducir el consumo de éstos desarrollando métodos miniaturizados y simples. Retomando la premisa anterior, se describe en este capítulo un método desarrollado para la determinación de Cr (VI) utilizando MSFIA como técnica de análisis en flujo y un diseño de SPE basada en disco como método de preconcentración, usando un dispositivo impreso 3D y como eluyente una disolución de un disolvente orgánico (metanol).

Inicialmente se evaluó la compatibilidad de dispositivos de flujo impresos 3D basados en polímeros fabricados utilizando la técnica SLA, respecto al uso de disolventes orgánicos de diferente naturaleza química que se pudiesen emplear para la elución de la SPE. De acuerdo a los resultados, el metanol diluido no presenta afectaciones en la estructura del dispositivo fabricado en un corto plazo.

Se utilizó el dispositivo impreso 3D para la extracción en fase sólida (SPE) en disco para obtener un método totalmente automatizado para la determinación de Cr (VI) en muestras de agua. El método propuesto comprende la reacción colorimétrica a partir de Cr (VI) y DPC en medio ácido, y su posterior retención en un disco SBD-RPS contenido dentro del dispositivo impreso 3D. Se utilizó MSFIA como técnica de análisis en flujo y la espectrofotometría en línea como método de detección para desarrollar el método automático en flujo.

El complejo extraído en el disco adsorbente se eluye con una mezcla de metanol-ácido sulfúrico, y el producto de la elución se cuantifica a 540 nm. En este trabajo se utiliza una combinación de la técnica multivariada y univariada para la optimización de las variables que afectan la señal analítica, en base al comportamiento de cada una de ellas.

Para el método desarrollado se obtiene un límite de detección de 1 ng de Cr (VI) y un rango lineal de trabajo de 3.2-600 ng de Cr (VI) usando un volumen de muestra de 2 mL. Las precisiones intra-día e inter-día expresadas como RSD fueron 4.8% ($10 \mu\text{g L}^{-1}$, $n = 12$) y 3.4% ($n = 5$, diferente días con un disco diferente), respectivamente.

El uso de disolvente orgánico con dispositivos impresos en 3D y la aplicabilidad del método desarrollado para la determinación de Cr (VI) en aguas naturales han sido

probados con resultados satisfactorios, la descripción del desarrollo del método se presenta en este capítulo.

7.2 Experimental

7.2.1 Reactivos

Todos los reactivos que fueron usados en este trabajo tenían grado analítico y el agua utilizada fue de calidad Millipore. Los estándares de Cr (VI) fueron preparados a partir de una disolución inicial de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr (VI) en presencia de 4% de HNO_3 (v/v). La disolución inicial (1000 mL) fue preparada a partir de dicromato de potasio (99.9%) y agregando 40 mL de HNO_3 (65%, Scharlau). Las muestras y las disoluciones estándar deben contener 4% de HNO_3 con la finalidad de asegurar el medio ácido requerido para la formación del complejo.

La disolución del reactivo cromogénico fue preparada agregando la cantidad requerida de 1,5-difenilcarbazida (DPC, Sigma Aldrich) disolviéndolo en 20 mL de metanol (Scharlau) y llevándolo a un volumen de 100 mL con agua. El eluyente requerido fue preparado adicionando cuidadosamente 16.67 mL de H_2SO_4 (96%, Scharlau) en 80 mL de metanol (99.9%, grado HPLC), debido al calor generado (mezcla exotérmica) cuando se mezclan ambos compuestos, y finalmente se llevó a un volumen de 100 mL con agua.

Se evaluaron como material adsorbente para la SPE basada en disco, los siguientes discos de 3M Empore: disco de intercambio aniónico (Anion-SR), disco C18 (C18), disco de poli(estireno-divinilbenceno) (SDB-XC) y disco de poli(estireno-divinilbenceno) sulfonado para fase reversa (SDB-RPS).

Para el estudio de los posibles interferentes fueron usados los siguientes reactivos: sulfato amónico férrico dodecahidratado, cloruro de sodio, carbonato de sodio anhidro, sulfato de sodio anhidro, fosfato disódico, ácido ascórbico (Scharlau), nitrato de sodio (Riedel de Haën) y disoluciones estándar (Scharlau) de Cd (II), Co (II), Cr (III), Cu (II), Pb (II), Mn (II), Ni (II), V (V), Al (III), Zn (II), Hg (II) y Mo (VI).

Para la evaluación de la estabilidad del dispositivo 3D se utilizaron los siguientes disolventes: cloroformo, tetracloruro de carbono, acetona, hexano, xilenol, metanol, etanol, acetonitrilo y acetato de etilo (Scharlau). El alcohol isopropílico (Scharlau) fue usado para eliminar los monómeros no polimerizados dentro del dispositivo impreso 3D.

7.2.2 Manifold e instrumentación

En la Figura 23 se puede observar una representación esquemática del sistema MSFIA desarrollado con un dispositivo diseñado e impreso 3D para SPE. El sistema está compuesto por una bureta multijeringa (BU4S, Crison Instruments, Barcelona, España) con 16,000 pasos y equipada con 3 jeringas de vidrio que se mueven simultáneamente, estas jeringas eran 2 de 5 mL (S1, S3) y 1 de 2.5 mL (S2) (Hamilton, Bonaduz, Suiza). El manifold utilizado para introducir la muestra al sistema y el transporte de los líquidos es semejante al descrito en la **sección 6.2.3 Manifold e instrumentos**, adaptado para 3 jeringas.

El sistema de detección utilizado estaba constituido por un espectrofotómetro CCD portable USB2000 (Ocean Optics, EUA), un diodo emisor de luz (LED) de color verde con una longitud de onda de 525 nm (nitruro de galio) utilizado como fuente de luz y una celda de flujo (Starna, Hainault, Gran Bretaña) con un paso óptico de 10 mm. La absorbancia fue medida a 540 nm, con un tiempo de integración de 5 ms y corrigiendo a una longitud de onda de 600 nm.

El control de los instrumentos, la adquisición y el procesamiento de datos se llevaron a cabo a través del programa AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems, Bunyola, España). En la etapa de optimización multivariante los datos fueron analizados con el programa Statistica (Statsoft, EUA).

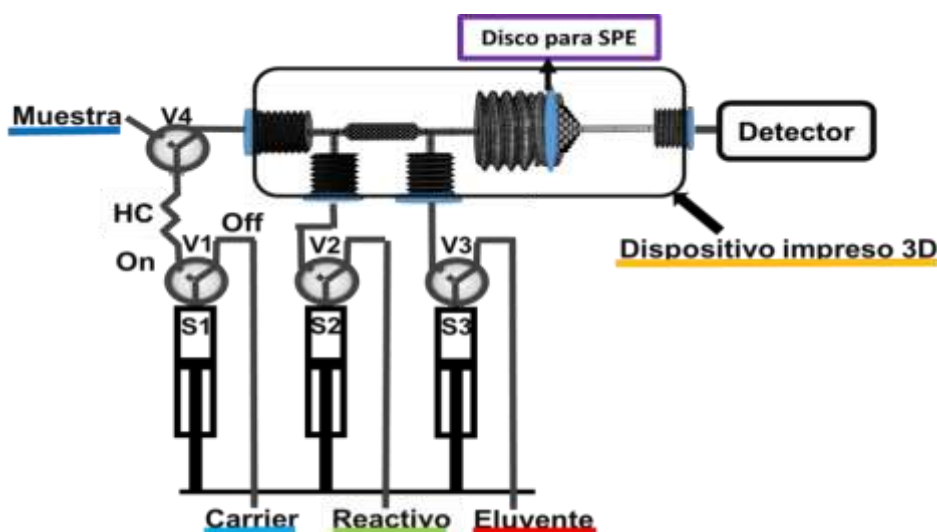


Figura 23. Representación esquemática del sistema desarrollado para la preconcentración y determinación de Cr (VI). V1-V4: Válvulas solenoides de tres vías; S1-S3: Jeringas;

HC: Bucle de carga

7.2.3 Procedimiento analítico

El procedimiento analítico para la preconcentración y determinación de Cr (VI) es descrito en la Tabla 15 y se resume a continuación: la muestra se carga en el bucle de carga (HC) usando V1 y V4 en posición “on”. Después, V1 y V2 son activadas en posición “on” para impulsar la muestra y el reactivo cromogénico (disolución de DPC-20% metanol, S2) para la formación del complejo dentro del mezclador, que está diseñado a base de cubos interconectados. El producto de la reacción se retiene en el disco adsorbente durante el paso del flujo después de pasar por el mezclador. En el siguiente paso, se inicia la adquisición de datos, después se activa V3 en posición “on” para introducir el eluyente (S3) y es enviado a través del disco adsorbente para la desorción y la subsecuente cuantificación del analito. Finalmente, el carrier (agua, S1) es inyectado para enjuagar el disco adsorbente y la celda de flujo antes de iniciar la siguiente medida.

Tabla 15. Procedimiento analítico para la preconcentración y determinación de Cr (VI) a través del método desarrollado

Paso	Descripción del paso	Instrucción	Válvulas				Volumen (mL)	Caudal (mL min ⁻¹)
			V1	V2	V3	V4		
1	Carga de muestra	Aspirar	on	off	off	on	2	2
2	Formación y retención del complejo Cr (VI)-DPC dentro del dispositivo impreso 3D	Dispensar	on	on	off	off	3	0.5
3	Inicio de la adquisición de datos							
4	Elución y cuantificación del analito	Dispensar	off	off	on	off	1	0.5
5	Limpieza del sistema con el carrier	Dispensar	on	off	off	off	1	2
6	Fin de la adquisición de datos							

7.2.4 Diseño del dispositivo impreso 3D

El diseño del dispositivo impreso 3D para la SPE está basado en un trabajo previo [171] con sus respectivas adaptaciones. El diseño está conformado por dos componentes y se describen a continuación: La parte 1 contiene un punto de confluencia y un mezclador para la formación del complejo previo a su extracción, también cuenta con un segundo punto de confluencia después del mezclador para introducir el eluyente al sistema; la

parte 2 del dispositivo contiene un soporte basado en una matriz de cubos interconectados con el propósito de soportar el disco de la SPE.

El diseño y las dimensiones del dispositivo utilizado en este trabajo se muestran en la Figura 24, las dimensiones de cada parte se resumen a continuación: las dimensiones de la parte 1 son 30.2 mm + 7 mm x 12.18 mm x 21 mm (longitud + longitud de la rosca x diámetro de la rosca x ancho), esta parte tiene un mezclador basado en cubos interconectados con las siguientes dimensiones 12.2 mm x 2.1 mm (longitud x ancho). Las dimensiones de los cubos son 0.4 mm de lado, 0.3 mm de separación entre cubos y 0.05 mm de superposición. Las dimensiones de la parte 2 son 31.9 mm x 21 mm (longitud x ancho), esta parte tiene un soporte basado en un cono truncado con una matriz de cubos interconectados en su interior. Las medidas de los cubos son 0.9 mm x 0.5 mm x 0.2 mm (lado x separación x superposición); el cono truncado tiene las siguientes medidas 1 mm x 7 mm x 3.7 mm (diámetro inferior, diámetro superior, altura). Finalmente, las roscas miden 6.52 mm x 7 mm (diámetro x longitud) y el canal de flujo tiene 1 mm de diámetro interno.

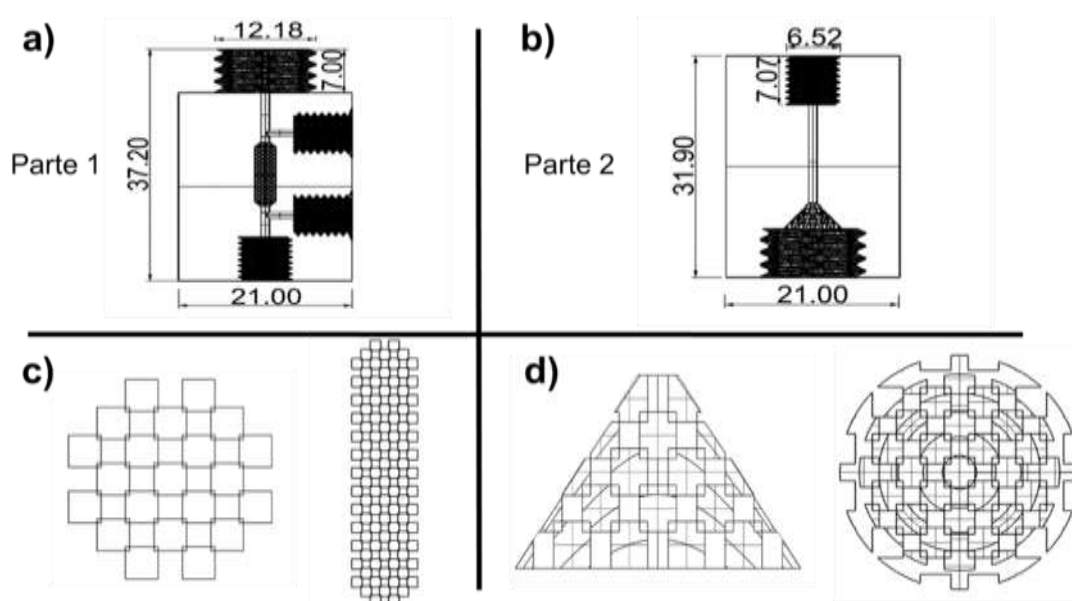


Figura 24. Partes y dimensiones del dispositivo impreso 3D para SPE basada en disco. Dimensiones en mm a) Parte 1, utilizada para la formación del complejo e inyección del eluyente; b) Parte 2, soporte para el disco adsorbente; c) Mezclador basado en cubos interconectados; d) Diseño del soporte para el disco adsorbente

El programa informático Rhinoceros 5 SR11 32 (McNeel & Associates, EUA) fue utilizado para el diseño del dispositivo impreso 3D. La impresión del dispositivo se llevó a cabo utilizando lo siguiente: una impresora Form 1+ (Formlabs Inc. Inc. Somerville, EUA), una resina fotoactiva transparente (Formlabs) y el software Preform (Formlabs). El procedimiento empleado para la limpieza y el proceso de curado del dispositivo impreso 3D fue el mismo utilizado en el trabajo anterior, descrito en la **sección 6.2.2 Diseño del dispositivo impreso 3D**.

Las condiciones de impresión 3D utilizadas son las siguientes: tiempo de impresión 187 min (2 piezas) y 228 min (4 piezas), 744 capas, resolución de 0.05 mm, posición vertical y sin utilizar soportes.

7.2.5 Evaluación de compatibilidad del dispositivo impreso 3D con disolventes orgánicos

Se utilizaron diferentes disolventes orgánicos para evaluar la compatibilidad con un dispositivo impreso 3D, y así valorar su potencial como eluyente para el método analítico propuesto. Los disolventes evaluados fueron el cloroformo, tetracloruro de carbono, acetona, hexano, xilenol, metanol, etanol, acetonitrilo y acetato de etilo. Se evaluó la estabilidad siguiendo este procedimiento: se pesaron 0.6 g de polímero impreso 3D, este polímero fue sumergido en 10 mL de cada uno de los disolventes seleccionados. Después de 60 min, se observó un daño significativo en el polímero impreso 3D usando acetona y cloroformo. En cambio, el metanol y acetonitrilo puros sólo causaron pequeñas fracturas en el dispositivo impreso 3D después de 6 días. Los disolventes orgánicos restantes analizados no causan un daño visible en el dispositivo impreso 3D después de 6 días.

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Condiciones iniciales de preconcentración

La determinación espectrofotométrica de Cr (VI) se llevó a cabo utilizando la formación del complejo a partir de Cr (VI)-DPC en medio ácido como paso previo a la extracción con disco adsorbente. Los estudios preliminares de SPE que se realizaron fueron la selección del tipo de disco adsorbente y la composición del eluyente.

Los siguientes discos fueron evaluados como adsorbentes potenciales para la retención del complejo: Disco de intercambio aniónico (Anion-SR), disco C18 (C18), disco de poli(estireno-divinilbenceno) (SDB-XC) y disco de poli(estireno-divinilbenceno) sulfonado para fase reversa (SDB-RPS). El porcentaje de retención fue estimado dividiendo la absorbancia neta después de la extracción entre la absorbancia neta obtenida sin preconcentración. Con el uso del disco SDB-RPS se obtiene una mejor extracción respecto a los otros discos evaluados, logrando un porcentaje de retención cercano al 100%. Dichos resultados se presentan en la Figura 25a.

La evaluación de la desorción del complejo formado del disco SDB-RPS se llevó a cabo utilizando diferentes disoluciones de disolventes orgánicos (metanol 80%, etanol 80%), disoluciones ácidas ($0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$) o mezclas de disolventes orgánicos en presencia de ácidos ($0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ y $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ en combinación con metanol 80% o etanol 80%). El metanol y etanol sin dilución no fueron analizados para evitar la afectación en la estabilidad del dispositivo impreso 3D, ya sea a medio o largo plazo, así como minimizar la producción de burbujas dentro del dispositivo de extracción, que pueden afectar la posterior detección del analito.

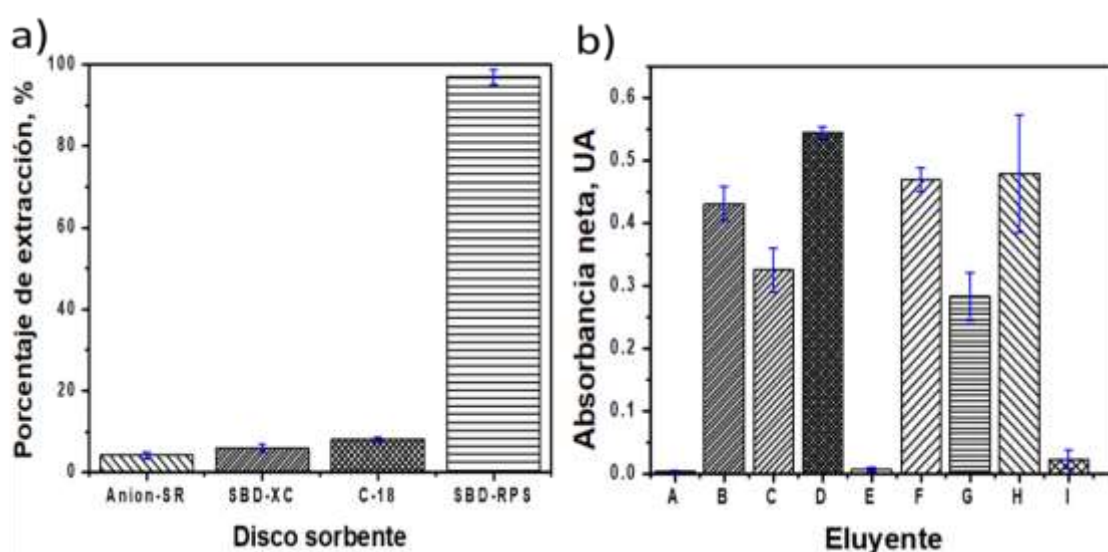


Figura 25. Estudios preliminares, selección del tipo de disco y eluyente para la determinación de Cr (VI). a) Comparación entre discos para la preconcentración de Cr (VI); b) Selección del eluyente, A: metanol 80%; B: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ -metanol 80%; C: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ -metanol 80%; D: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - metanol 80%; E: etanol 80%; F: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ - etanol 80%; G: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ - etanol 80%; H: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - etanol 80%; I: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$

En la Figura 25b se muestra que la mezcla de $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - metanol 80% presenta la mejor elución en comparación con el resto de las disoluciones evaluadas. En el caso de la mezcla $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - etanol 80%, presenta mayor error en los resultados debido a la formación de burbujas dentro del sistema. Por lo anterior, se seleccionó como eluyente la mezcla ácido sulfúrico- metanol para los siguientes experimentos.

7.3.2 Optimización de condiciones experimentales

7.3.2.1 Optimización univariante

Los valores óptimos de las principales variables de operación del método propuesto se obtuvieron aplicando dos métodos de optimización: el método univariado y el multivariado. En el método univariante se estudiaron la concentración de ácido nítrico en la muestra y el porcentaje de metanol en el eluyente, estas variables tienen un efecto significativo en la señal analítica y pueden ocultar los efectos ocasionados por el resto de las variables a estudiar.

El efecto del porcentaje de metanol en el eluyente fue evaluado en el rango de 0 - 80% (v/v). Los porcentajes mayores a 80% no se evaluaron debido a la formación de burbujas dentro de las tuberías del sistema, lo que afectaría la señal analítica. En la Figura 26a se puede observar que la mejor desorción del complejo se obtiene con el límite máximo del rango experimental estudiado para esta variable, debido a que también se tiene un efecto positivo en la señal, es decir, al aumentar la cantidad de metanol se incrementa la elución del complejo, por lo tanto el porcentaje de metanol utilizado para los experimentos posteriores fue de 80%.

La concentración de HNO_3 en la muestra provee el medio ácido que requiere la formación del complejo a partir de Cr (VI)-DPC ($\text{pH}<2$) [172]. Esta variable fue estudiada en el rango 0 - 5% (v/v) de HNO_3 presente en la muestra. En la Figura 26b se puede observar que el porcentaje de ácido tiene un efecto positivo en la señal medida, por lo tanto la absorbancia neta se incrementa cuando se aumenta el porcentaje de ácido en la muestra. Para futuros experimentos se seleccionó 4% de HNO_3 como medio ácido de la muestra, ya que con este valor se asegura el medio ácido requerido para la formación del complejo y su retención en el material adsorbente.

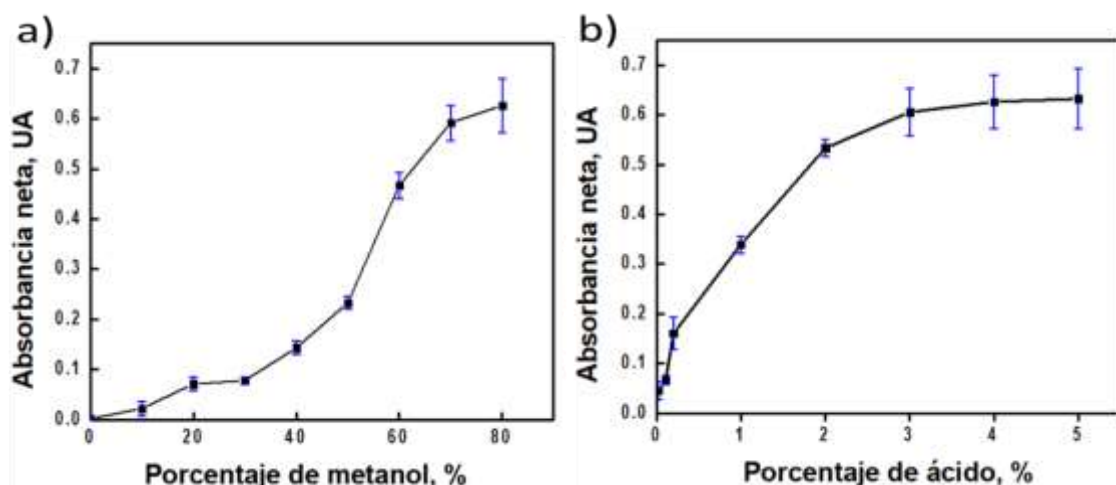


Figura 26. Estudio univariante de las variables del método propuesto. a) Porcentaje de metanol en el eluyente y b) Porcentaje de HNO₃ en la muestra

7.3.2.2 Optimización multivariante

En la etapa de optimización multivariante se evaluaron las siguientes variables: la concentración de H₂SO₄ en el eluyente, caudales en la extracción y elución, concentración de reactivo cromogénico (DPC) y volumen de eluyente. El análisis estadístico se llevó a cabo de la siguiente manera: en la primera etapa, se aplicó un método de cribado (screening) para estudiar las variables independientes y las interacciones entre ellas, así como el grado de afectación en la señal analítica. Se utilizó como método de screening un diseño factorial completo 2^k para 5 variables incluyendo 3 puntos centrales. Los rangos estudiados para esta etapa fueron 0.5-2.5 mol L⁻¹ (concentración de H₂SO₄), 0.5-2.5 mL min⁻¹ (caudales de extracción y elución), 2.5 x 10⁻³-1.75 x 10⁻² % (concentración de DPC, p/v) y 0.5-3.5 mL (volumen de eluyente). Para el diseño planteado se realizaron 35 experimentos y los resultados fueron analizados a través del diagrama de Pareto (Figura 27).

Los datos obtenidos se ajustan a un modelo lineal incluyendo interacciones de tercer orden; el volumen del eluyente, la falta de ajuste y la curvatura no son significativos con un intervalo de confianza de 99%, y por lo tanto las variables pueden ser analizadas de forma individual, de acuerdo a su comportamiento lineal presentado.

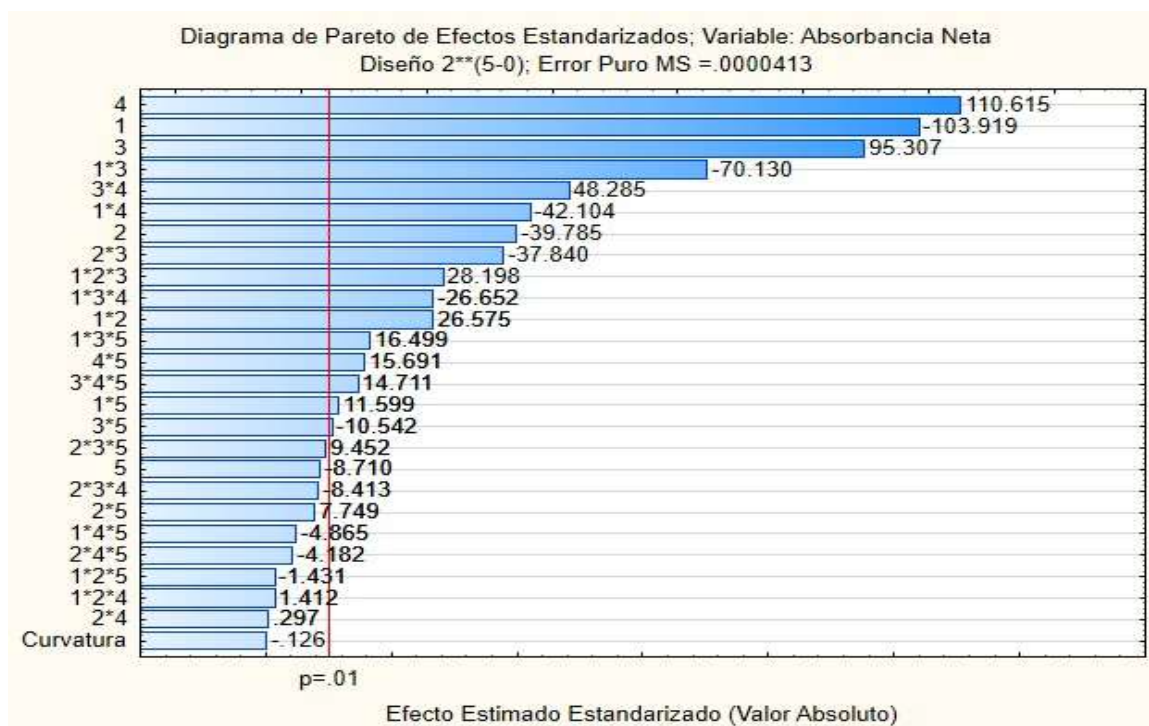


Figura 27. Diagrama de Pareto del screening 2⁵, analizando la absorbancia neta para la determinación de Cr (VI). Nivel de confianza del 99% (p=0.01). 1: Caudal de extracción; 2: Caudal de elución; 3: Concentración de H₂SO₄; 4: Concentración de DPC; 5: Volumen de eluyente; *: Interacción de segundo o tercer orden

En el diagrama de Pareto se demuestra que, en estas condiciones experimentales, los caudales en la extracción y elución son significativos teniendo un efecto negativo en la señal analítica. El caudal mínimo evaluado se estableció en base a la bomba del módulo multijeringa en combinación con una jeringa de 5 mL (0.5 mL min⁻¹) y este valor fue adoptado para los siguientes experimentos, basándose en el efecto negativo observado sobre la señal analítica. La concentración de H₂SO₄ y DPC son significativas con un efecto positivo en la respuesta, conforme lo obtenido en el diagrama de Pareto. Se recomienda estudiar rangos mayores al límite máximo utilizado para la etapa de screening para ambas variables con el objetivo de obtener los valores óptimos para el método propuesto. Estas dos variables se analizaron en un segundo diseño (método de superficie de respuesta) para encontrar sus valores óptimos.

En la segunda etapa, como método estadístico de análisis de superficie de respuesta se utilizó una matriz de Doehlert para dos variables (concentración de H₂SO₄ y DPC), incluyendo tres puntos centrales. La matriz de Doehlert está basada en un diseño

hexagonal con dos variables, la cual permite estudiar a profundidad el factor o variables más significativas respecto a estudios previos, como es el caso del screening, en mayor número de niveles [173]. Los rangos utilizados para esta etapa son $1.5\text{-}3.5\text{ mol L}^{-1}\text{ H}_2\text{SO}_4$ y $0.01\text{-}0.025\%$ (concentración de DPC, p/v). Se realizaron 9 experimentos para este diseño y los resultados se analizaron a través de la función de deseabilidad, utilizando como variable dependiente la absorbancia neta (Figura 28). Los datos se ajustaron a un modelo lineal-cuadrático con interacciones de segundo orden y evaluados en un intervalo de confianza de 95%. La concentración de H_2SO_4 y DPC muestran un máximo a 0 y 0.433 (valores codificados), respectivamente, que corresponden a 3 mol L^{-1} para el H_2SO_4 y 0.0175% para DPC (p/v), estos valores fueron utilizados para los experimentos restantes.

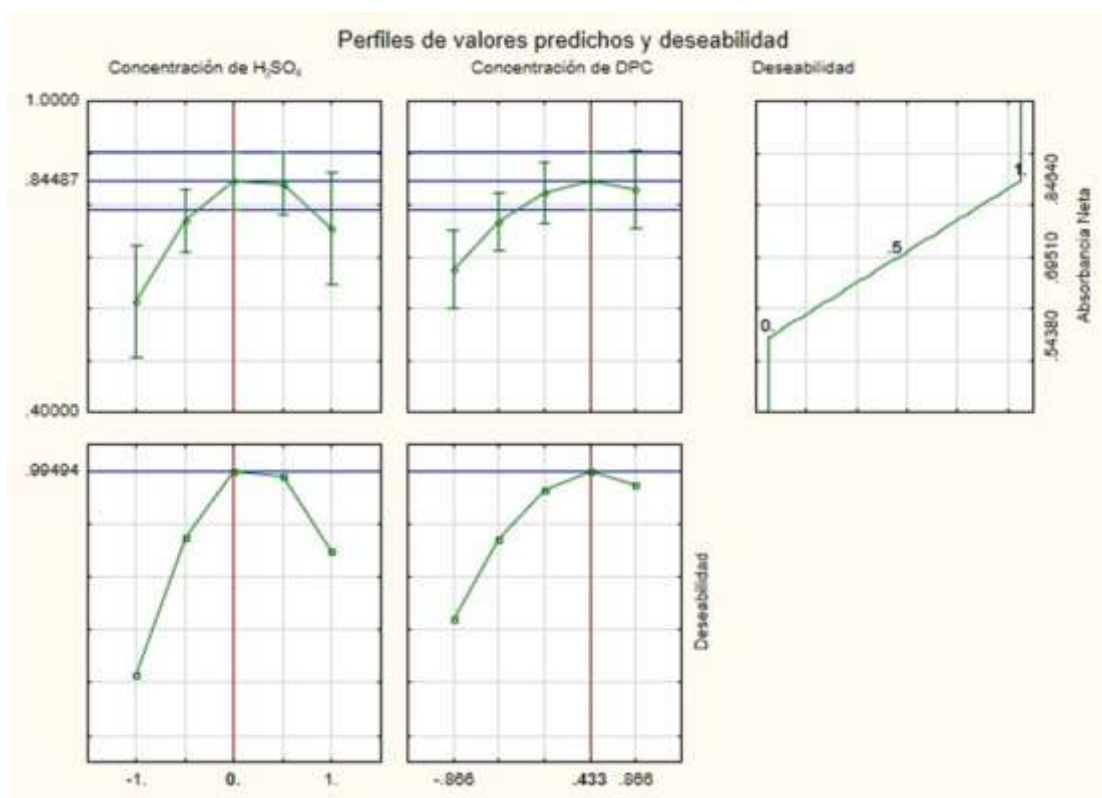


Figura 28. Función de deseabilidad para la matriz de Doehlert. Nivel de confianza de 95% ($p=0.05$). La línea punteada indica los valores codificados después de la optimización usando la matriz de Doehlert

7.3.3 Parámetros analíticos

Las características analíticas del método desarrollado fueron obtenidas con las condiciones experimentales previamente optimizadas y se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16. Parámetros analíticos del método optimizado para la preconcentración y determinación de Cr (VI)

Parámetros analíticos	Cr (VI)
Límite de detección (ng)	1.0
Límite de cuantificación (ng)	3.2
Rango lineal de trabajo (ng)	3.2 -600
Sensibilidad (UA/μg)	0.0032
Precisión intra-día (n=12, RSD %)	4.8*/3.1**
Precisión inter-día (n=5, RSD %)	3.4
Frecuencia de análisis (h^{-1})	6
Durabilidad del disco (inyecciones)	49

*Nivel menor ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) ** Nivel mayor ($70 \mu\text{g L}^{-1}$)

La curva de calibración [absorbancia vs concentración de Cr (VI)] para la determinación de Cr (VI) fue obtenida con resultados estadísticamente satisfactorios [$y=0.0032$ (ng Cr (VI)) + 0.0421], (n=10, $R^2=0.9994$), con un rango lineal de trabajo que va desde 3.2 ng hasta 600 ng Cr (VI). El límite de detección (LOD) fue de 1.0 ng de Cr (VI) (volumen de muestra, 2 mL), calculado multiplicando tres veces la desviación estándar de 10 réplicas del blanco dividiendo entre la pendiente de la curva de calibración. La respuesta analítica de la preconcentración fue lineal desde 2 mL hasta 16 mL de volumen de muestra ($70 \mu\text{g L}^{-1}$). El LOD expresado en unidades de concentración es $0.0625 \mu\text{g L}^{-1}$ para un volumen de muestra de 16 mL. El LOD del método propuesto es menor en comparación con trabajos previos automatizados con detección espectrofotométrica para la preconcentración y determinación de Cr (VI) [172,174–177].

La precisión intra-día fue calculada como desviación estándar relativa (RSD) a dos diferentes niveles de concentración del analito de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ y $70 \mu\text{g L}^{-1}$ (n=12), usando 2 mL de muestra, obteniéndose 4.8% y 3.1%, respectivamente. Por otro lado, la

precisión inter-día fue calculada usando 2 mL de muestra ($70 \mu\text{g L}^{-1}$) realizando 5 determinaciones en 5 diferentes días de trabajo ($n=5$), y a su vez usando diferentes discos adsorbentes cada día, el resultado obtenido fue de 3.4% (expresado como RSD).

La frecuencia de análisis fue de 6 h^{-1} usando 2 mL de muestra. El tiempo de vida media del disco adsorbente se obtuvo realizando inyecciones sucesivas de 2 mL de disolución estándar con concentración de $70 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr (VI). Para ello, el disco adsorbente fue reusado hasta 49 veces con recuperaciones de hasta el 95%.

Se llevó a cabo un estudio de saturación del disco adsorbente utilizando una disolución de $70 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr (VI). Se realizaron inyecciones consecutivas de 1 mL de muestra haciendo pasar el complejo a través del disco adsorbente, hasta que el disco adsorbente presentara una saturación. Se utilizaron 88 mL de la disolución estándar de Cr (VI) sin aparente saturación. Sin embargo, a volúmenes mayores de muestra se produce sobrepresión en el sistema, debido a que una cantidad mayor de complejo formado a partir de Cr (VI)-DPC obstruye el espacio entre las partículas del disco adsorbente.

7.3.4 Interferencias

En esta etapa se estudió el efecto de diferentes aniones y cationes, con el propósito de evaluarlos como posibles interferentes. Como criterio se estableció que se considera interferente si existe una variación de $\pm 10 \%$ en la señal analítica. Los cationes Cd (II), Co (II), Cr (III), Cu (II), Pb (II), Mn (II), Ni (II), V (V), Al (III), Zn (II), Hg (II), Mo (VI) y Fe (III) fueron seleccionados para esta etapa. Para los cationes Zn (II), Pb (II), Co (II) y Mo (VI) se observó un nivel de tolerancia de 1000:1. Los iones Hg (II) y V (V) presentaron una interferencia positiva con un nivel de tolerancia de 1000:1 y 500:1, respectivamente. El ion Fe (III) causó una interferencia positiva en la relación 1:1, por lo que se adicionaron $2.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de EDTA como agente enmascarante, eliminando la interferencia hasta un nivel de tolerancia de 1000:1. Los iones Cu (II), Cd (II), Ni (II), Al (III), Cr (III) y Mn (II) no muestran una interferencia significativa a un nivel de 1000:1.

En el caso de los aniones, se evaluaron los siguientes iones: sulfato, nitrato, fosfato, carbonato y cloruros. El ion cloruro no presenta interferencias a 70,000:1, y para los aniones restantes no se observa ninguna interferencia a un nivel de 15,000:1.

7.3.5 Validación y aplicación del método propuesto

El método desarrollado fue aplicado a través del análisis de 3 diferentes tipos de muestras de agua, con la finalidad de analizar la presencia de Cr (VI) a bajas concentraciones y evaluar el desempeño del método en este tipo de matrices ambientales. Cuatro muestras fueron de agua de pozo, una de agua superficial y 2 de lixiviados, estas muestras fueron obtenidas en diferentes localizaciones de Mallorca, España. Todas las muestras fueron acidificadas con 4% de HNO₃ y después fueron sometidas a un proceso de filtración, para lo cual se utilizó un filtro de Nylon (0.45 μm), para posteriormente analizarlas. Debido a la presencia de Fe (III) y otros posibles interferentes en las muestras, se agregaron 2.2 μmol L⁻¹ de EDTA. En esta etapa se utilizaron 2 mL de muestra y se realizaron tres réplicas por cada muestra. Las muestras fueron analizadas comparando el método desarrollado con el método estándar basado en la detección espectrofotométrica del complejo Cr (VI)-DPC siguiendo el procedimiento manual [178].

Los resultados son detallados en la Tabla 17, en los cuales se puede observar que las recuperaciones obtenidas para Cr (VI) fueron satisfactorias para cada una de las muestras, el rango de recuperaciones varía entre el 95 y 105 %. La concentración de Cr (VI) en las muestras es menor al límite de detección del método estándar (36.4 μmol L⁻¹), excepto para la muestra de lixiviado 2. Por lo tanto, se puede mencionar que no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos. No obstante, el resultado no puede ser concluyente debido a que el método estándar no utiliza preconcentración, por lo que se sugiere complementar la aplicación y validación con el método de adición-recuperación, agregando concentraciones bajas del analito.

Las muestras de agua de pozo del análisis anterior se utilizaron para la evaluación del método propuesto con volúmenes grandes de muestra (8 mL). Los niveles traza de Cr (VI) fueron detectados en tres de las muestras analizadas. Cada muestra fue añadida con dos diferentes concentraciones de Cr (VI). En la Tabla 18 se muestran los resultados de esta evaluación, las recuperaciones fueron satisfactorias para cada una de las muestras, en un rango entre 98 y 105%.

Tabla 17. Aplicación del método desarrollado para la determinación de Cr (VI)

Muestra	Método desarrollado			Método estándar	
	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)
Agua de pozo 1	0	< LOD		< LOD	
	70	73 ± 3	104	68 ± 0	96
Agua de pozo 2	0	< LOD		< LOD	
	70	72 ± 2	103	68 ± 0	96
Agua de pozo 3	0	< LOD		< LOD	
	70	73 ± 0	104	68 ± 0	96
Agua de pozo 4	0	< LOD		< LOD	
	70	69 ± 1	99	68 ± 0	96
Agua superficial	0	8.7 ± 0.4		< LOD	
	70	80 ± 1	101	82 ± 1	104
Lixiviado 1	0	10 ± 0		< LOD	
	70	78 ± 3	97	85 ± 4	105
Lixiviado 2	0	52 ± 3		54 ± 1	
	70	116 ± 6	95	125 ± 1	101

Volumen de muestra 2 mL; los resultados son expresados como \pm desviación estándar de tres réplicas.

Tabla 18. Análisis de muestras de agua de pozo por el método propuesto usando un volumen de muestra de 8 mL

Muestra	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)
Agua de pozo 1	0	0.84 ± 0.03	
	5	6.0 ± 0.4	103
	10	10.6 ± 0.6	98
Agua de pozo 2	0	0.54 ± 0.04	
	5	5.6 ± 0.4	101
	10	10.6 ± 0.4	100
Agua de pozo 3	0	1.5 ± 0.10	
	5	6.8 ± 0.4	105
	10	12.1 ± 0.5	105
Agua de pozo 4	0	< LOD	
	5	5.2 ± 0.2	104
	10	10.5 ± 0.30	105

Los resultados son expresados como \pm desviación estándar de tres réplicas.

7.4 Conclusiones

La extracción en fase sólida basada en disco dentro de un dispositivo impreso 3D permite la preconcentración y determinación de Cr (VI) con resultados satisfactorios. La estructura de los dispositivos impresos 3D por la técnica estereolitografía (SLA) no presenta afectación significativa por el uso de disolventes orgánicos en la etapa de elución (metanol/agua, 80/20, v/v).

La derivatización y preconcentración de Cr (VI) fueron llevadas a cabo dentro de un solo dispositivo, sin la necesidad de adicionar otros accesorios de flujo, logrando una disminución en el límite de detección. A través del uso de mezcladores en el dispositivo impreso 3D se logra mejorar la formación del complejo a partir de Cr (VI)-DPC dentro del dispositivo impreso 3D, sin requerir un bucle de reacción de tuberías tradicionalmente utilizadas. El método desarrollado es una alternativa miniaturizada, efectiva y simple para la determinación de Cr (VI) en muestras de agua.

CAPÍTULO 8

Foto-inmovilización de disco adsorbente para la preconcentración multielemental con detección ICP- OES

8.1 Resumen

La versatilidad de los dispositivos impresos 3D está siendo actualmente estudiada y comprobada en el pretratamiento de muestras, resultando un tema de interés de investigación. En este capítulo se presenta un método de preconcentración multielemental utilizando la impresión 3D a través de la técnica SLA para el diseño e impresión de dispositivos rotatorios para su aplicación en la determinación de metales en muestras ambientales con detección ICP-OES.

El pretratamiento establecido para el análisis de metales es la extracción con disco rotativo (RDSE), pero se realiza con una nueva modificación a esta técnica, la cual consiste en la foto-inmovilización directa de discos de extracción en la superficie de los dispositivos impresos 3D fabricados por estereolitografía (SLA). Esta técnica de impresión ha permitido la fabricación rápida, simple y altamente reproducible de dispositivos para extracción de disco giratorio impresos 3D (RDSE). Inmediatamente después de la impresión del dispositivo RDSE, se introducen en el dispositivo dos imanes y se adhiere un disco adsorbente, quedando, después del curado UV posterior a la impresión permanentemente, inmovilizados con resina fotoactiva.

El propósito de utilizar dispositivos RDSE impresos 3D en la determinación de 14 metales utilizando la detección de ICP-OES, fue eliminar el efecto de matriz en muestras complejas. Para el análisis se utilizó un volumen de muestra de 20 mL, un tiempo de extracción de 360 min (a 600 rpm) y se eluyó con 2 mL de una disolución de 3 mol L^{-1} HNO_3 durante 20 min (500 rpm). Las características analíticas más relevantes que se obtuvieron son LODs de entre $0.03\text{-}1.27 \mu\text{g L}^{-1}$, y buenos resultados en la precisión utilizando 5 dispositivos diferentes impresos en días diferentes para los 14 metales probados ($\text{RSD} = 2.7\text{-}8.3\%$). La validación del método se llevó a cabo utilizando muestras de referencia certificadas de aguas residuales y suelo. El método se aplicó al análisis de muestras de agua obteniendo recuperaciones satisfactorias. Se analizaron tres muestras de lixiviados de plantas de tratamiento de residuos sólidos altamente contaminados, logrando recuperaciones de 91-108% y una muestra de agua subterránea (91-106%), sin requerir un pretratamiento adicional.

Se evaluó el efecto de la geometría de los dispositivos en la extracción con nueve diferentes diseños RDSE impresos 3D, mostrando la versatilidad del método desarrollado, y se evaluó su rendimiento en la extracción del complejo formado entre el Cr (VI) y la 1,

5-difenilcarbazida. El método desarrollado representa una solución simple, eficiente y rentable para la extracción de este contaminante altamente tóxico.

8.2 Experimental

8.2.1 Reactivos

Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico y las disoluciones se prepararon con agua de calidad Millipore (resistividad $-18,2 \Omega \text{ cm}$). Para preparar las disoluciones estándar requeridas para la cuantificación de los metales se partió de una disolución estándar ICP multielemental X26 (26 elementos; Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, Ti, V, Zn; M010, Scharlau) conteniendo 100 mg L^{-1} de cada uno de los elementos. Estas disoluciones se prepararon en ácido nítrico al 5% (v/v). Se preparó una disolución de acetato de amonio 0.1 mol L^{-1} (96% extra puro, Scharlau) como medio de muestra, y una disolución $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ (65%, Scharlau) como eluyente. Los discos quelantes 3M Empore se usaron como material adsorbente.

Se utilizó una disolución de 2% de HNO_3 (v/v) como carrier para la determinación de metales con ICP-OES. Para las pruebas visuales de la evaluación de la geometría en los dispositivos impresos 3D, se preparó una disolución de 1,5-difenilcarbazida (DPC, Sigma Aldrich) en metanol al 20% (Scharlau) (p/v), que se utilizó como reactivo cromogénico para la complejación de Cr (VI). La disolución madre de Cr (VI) de 1000 mg L^{-1} fue utilizada para preparar las disoluciones de trabajo conteniendo HNO_3 al 4% (v/v).

Para eliminar los monómeros sin reaccionar de los dispositivos impresos 3D se enjuagó con alcohol isopropílico (99%, Scharlau).

8.2.2 Instrumentos

El diseño de los dispositivos se llevó a cabo utilizando el programa informático Rhinoceros 5 SR 11 (McNeel & Associates, EE. UU.); para la fabricación de los dispositivos se utilizó una impresora 3D Form 2+ (Formlabs Inc. Somerville, EUA). Además, para la etapa de curado de los dispositivos impresos 3D se empleó una cámara

ultravioleta CL-100 (UVP, Upland, Canadá) con diferentes lámparas ultravioleta de 365 nm.

Los dispositivos impresos 3D se agitaron utilizando un Multivix-D MM90-E (OVAN, Barcelona, España) con 9 posiciones. Para la determinación de metales se utilizó un ICP-OES (Optima 5300 DV, Perkin Elmer ® Inc.) como sistema de detección acoplado a un sistema de introducción de muestra ESI One Fast (Elemental Scientific, EUA). Las condiciones experimentales del instrumento ICP-OES para la cuantificación de los analitos en este trabajo se detallan en la Tabla 19.

Tabla 19. Condiciones de operación del ICP-OES Perkin Elmer Optima 5300

Parámetro	Valor
Potencia del generador de radiofrecuencia	1300w
Generador de radiofrecuencia de estado sólido	40Hz
Flujo de argón (Plasma)	15 L min ⁻¹
Flujo de argón (Nebulizador)	0.7 L min ⁻¹
Flujo auxiliar de argón	0.2 L min ⁻¹
Tiempo de espera	15 s
Caudal de muestra	1.5 mL min ⁻¹

8.2.3 Fabricación y diseño de dispositivos rotatorios impresos 3D

El procedimiento para la fabricación de los dispositivos RDSE impresos 3D se muestra en la Figura 29. Los diseños desarrollados se imprimen en 3D desde un archivo digital con formato *.STL. Después de la impresión y previo a la etapa de curado, el dispositivo impreso en 3D se enjuaga con alcohol isopropílico y se colocan dos imanes de neodimio (6 mm de diámetro x 2 mm de altura) en las cavidades cilíndricas de la cara inferior del dispositivo impreso 3D. El espacio restante después de colocar los imanes se llena con varias gotas de la resina no polimerizada para la impresión 3D, para evitar el deterioro de los imanes cuando se usan disoluciones ácidas en la etapa de elución.

El dispositivo impreso 3D que contiene los imanes se coloca boca abajo en la cámara UV y se cura durante 4 h. Después, se coloca una capa de resina no polimerizada en la cara superior del dispositivo impreso 3D, con el propósito de inmovilizar el disco quelante (10 mm de diámetro), se coloca otra vez el dispositivo en la cámara ultravioleta para curar durante 60 minutos, de esta manera el disco de extracción se adhiere permanentemente al dispositivo impreso 3D. El disco quelante es acondicionado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, previo a su uso en la inmovilización.

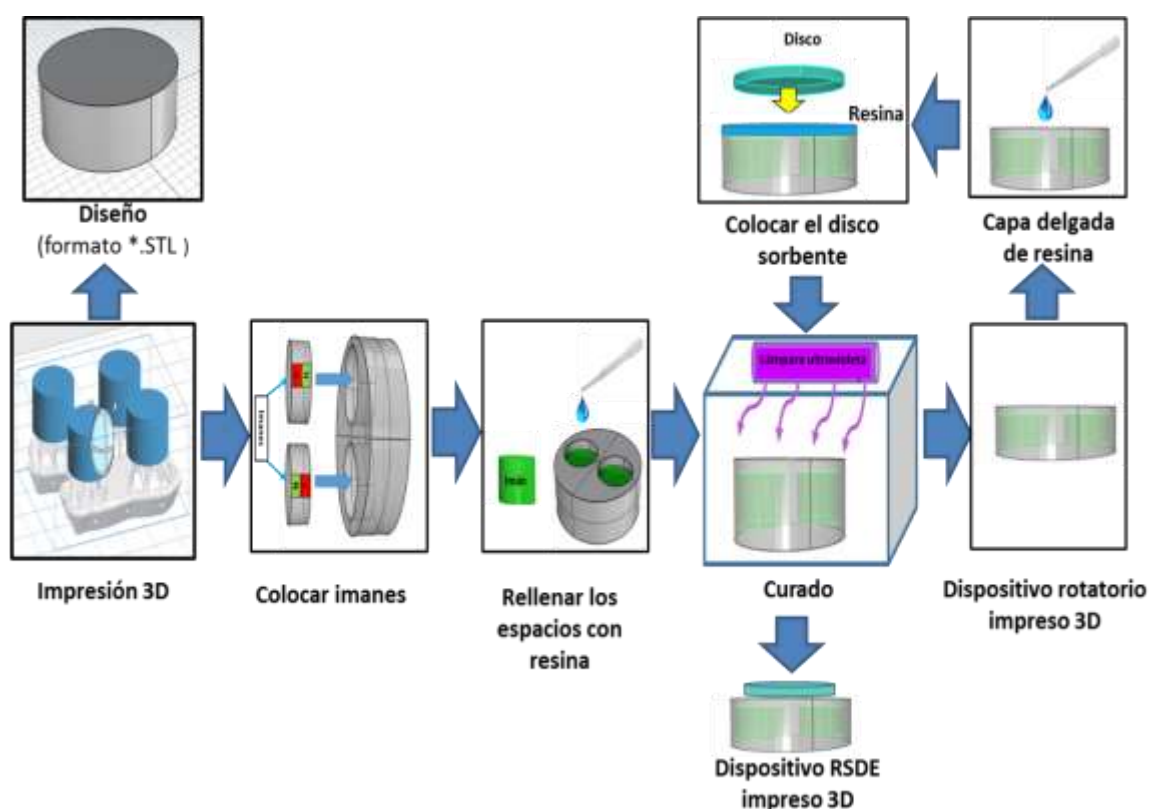


Figura 29. Esquema del procedimiento para fabricar los dispositivos RDSE impresos 3D

Para reutilizar el dispositivo fabricado y renovar el disco, éste se separa del dispositivo impreso 3D con una cuchilla. Después, se aplica una capa delgada de resina fotopolimerizable a la parte deseada del dispositivo, posteriormente se coloca un nuevo disco quelante y finalmente el dispositivo con el disco se cura con lámpara ultravioleta a 365 nm durante 60 min, obteniendo así el nuevo dispositivo.

8.2.4 Procedimiento analítico

La extracción con disco rotatorio utilizando un dispositivo impreso 3D se llevó a cabo en viales de vidrio que contenían la muestra a pH 5.3, medio que se logra añadiendo 0.1 mol L^{-1} de acetato de amonio. Al agregar la muestra al vial, el dispositivo RDSE impreso 3D se coloca dentro y el vial se pone sobre la placa magnética, a su vez se regula la velocidad de agitación apropiada para la etapa de extracción de los analitos. Al término de la etapa de extracción, el dispositivo impreso 3D se enjuaga con agua para eliminar totalmente la matriz y los residuos dentro del vial. Finalmente los metales extraídos se eluyen con una disolución de $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$. La acidez del eluato se ajusta añadiendo 2 mL de agua previo al análisis con el sistema de detección ICP-OES.

8.3 Resultados y discusión

8.3.1 Aplicaciones y diseños de RDSE

Se evaluó la influencia de la geometría de los dispositivos impresos 3D para su aplicación en RDSE diseñando 9 diferentes dispositivos RDSE impresos 3D y se aplicaron en la extracción de un complejo colorimétrico para su comparación.

8.3.1.1 Dimensiones de los diseños de los dispositivos impresos 3D aplicados a RDSE

Se diseñaron 9 dispositivos (Ver Figura 30) con geometrías diferentes (D1-D9), los diseños D1 (circular), D3 (rectangular), D6 (piramidal) y D8 (cuadrado) se basan en geometrías simples. En cambio, los dispositivos D2, D5 y D7 se fabricaron para evaluar el rendimiento de la extracción respecto al aumento del flujo turbulento causado por estas estructuras diseñadas. Los dispositivos D4 (estructura de puente) y D9 (forma de tubo) tienen una base como D1 pero con variaciones en su estructura, diseñadas con el mismo propósito de los diseños anteriores. Además, estos dispositivos tienen orificios en su estructura para una mayor interacción de la muestra con el material adsorbente en la parte inferior.

A continuación se encuentra una descripción más detallada de los dispositivos diseñados:

- D1 es un cilindro sólido.
- D2 es el mismo cilindro del diseño circular D1, pero incluye un disco a 90° con 1 mm de espesor y 15 mm de diámetro. El cilindro base y el disco están superpuestos en 1 mm, el disco tiene 9 orificios distribuidos de manera uniforme.
- D3 tiene un diseño rectangular. El ancho de D3 mide 8 mm.
- D4 está constituido por una base construida con dos cilindros y un soporte circular para el material adsorbente. Este soporte tiene 12 agujeros de 1 mm de diámetro cada uno.
- D5 tiene la misma base cilíndrica que D1 pero con una superficie curva en la parte superior. La estructura curva tiene 0.5 mm de espesor, una superposición de 0.5 mm y un radio de curvatura de 6.69 mm.
- D6 es una pirámide triangular de base rectangular.
- D7 tiene la misma base cilíndrica que D1 pero incluyendo en su diseño un cono truncado arriba de la base, con una superposición de 0.33 mm. El cono tiene 32 orificios de 1 mm de diámetro.
- D8 es un dispositivo sólido de base cuadrada.
- D9 es un sólido en forma de tubería con un diámetro interno de 5 mm y un diámetro externo de 18.5 mm.

En todos los diseños evaluados, los dispositivos fabricados tienen dos vacíos cilíndricos en su base con dimensiones de 6 mm de diámetro x 5 mm de altura, estos cilindros vacíos se utilizan para colocar los imanes. Para visualizar adecuadamente las dimensiones y los diseños, en la Figura 30 se muestra cada uno de los diseños y sus dimensiones, expresadas en mm.

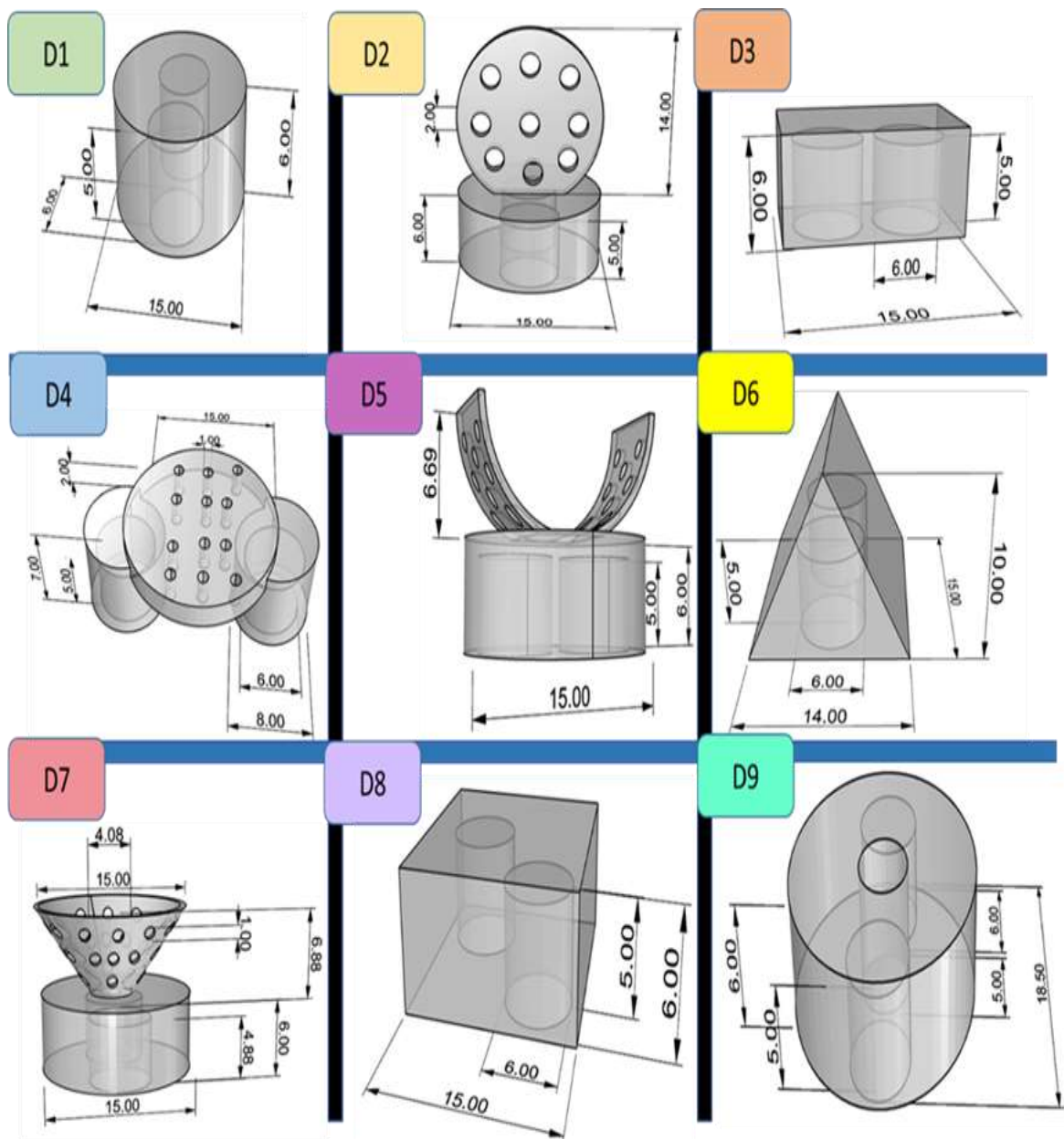


Figura 30. Dimensiones y diseño de dispositivos impresos 3D para RDSE. Las dimensiones están expresadas en mm

Los parámetros de impresión 3D para los dispositivos utilizados en este trabajo se encuentran descritos en la Tabla 20, la reproducibilidad de los dispositivos dependerá de estas condiciones. La posición expuesta en la Tabla 20 está sujeta a la mostrada en la Figura 30 y cabe recalcar que todos los dispositivos utilizan soportes para su impresión.

Tabla 20. Parámetros para la impresión 3D de dispositivos RDSE

<i>Dispositivo</i>	<i>Capas</i>	<i>Posición</i>	<i>Volumen de resina (mL)</i>	<i>Tiempo (min) 1 pieza</i>	<i>Tiempo (min) 4 piezas</i>
<i>D1</i>	195	Vertical*	1.49	42	59
<i>D2</i>	375	Lateral**	1.60	62	81
<i>D3</i>	195	Vertical*	1.04	40	52
<i>D4</i>	375	Lateral**	1.43	60	78
<i>D5</i>	329	Vertical*	1.66	56	75
<i>D6</i>	275	Vertical*	1.44	50	66
<i>D7</i>	385	Vertical*	1.72	63	83
<i>D8</i>	195	Vertical*	1.91	43	63
<i>D9</i>	195	Vertical*	2.11	44	65

* Posición igual respecto a la Figura 32 ** Posición a 90° (derecha) respecto a la Figura 30

8.3.1.2 Aplicación de diferentes geometrías de dispositivos RDSE impresos 3D

Para estudiar el efecto de la geometría del soporte del disco en los dispositivos RDSE impresos 3D, se ajustó la forma del disco adsorbente a cada diseño (Figura 31a) manteniendo constante el área del material adsorbente (31.4 mm^2). Como estudio modelo, se utilizó la extracción del complejo formado a partir de DPC y Cr (VI), empleando un disco SDB-RPS. La disolución estándar de Cr (VI) ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) se mezcla con la disolución del reactivo cromogénico (0.02%, p/v, 20% de metanol) en una proporción de 2:1. La cantidad de complejo no extraído se mide en un espectrofotómetro UV-Vis a 540 nm.

El estudio de extracción se llevó a cabo durante 6 min (velocidad de agitación, 500 rpm), midiendo la cantidad de complejo extraído cada minuto (Figura 31b). Al comparar los dispositivos con geometría simple (D1, D3, D6, D8), el dispositivo redondeado (D1) mostró el mejor rendimiento para la aplicación seleccionada, ya que extraía más del 80% del complejo formado. Con las geometrías rectangulares (D3) y cuadradas (D8) se obtuvieron resultados similares, en ambos casos fue extraído menos del 60% del complejo y con el dispositivo RDSE de forma triangular (D6) fue extraído menos del 50%.

Los resultados obtenidos con los dispositivos basados a partir de D1 (D2, D4, D5, D7, D9) se compararon los resultados de D1 para la extracción del complejo formado a partir de Cr (VI) -DPC. Se obtuvo un rendimiento similar para D5 y D7 que extrajeron más del 80% del complejo. También se observó un rendimiento ligeramente inferior para D2, y con D9 el 60% del complejo se extrajo. El diseño con menor rendimiento de extracción fue obtenido con D4, basado en un disco perforado con dos bases. De acuerdo con los resultados obtenidos, los dispositivos RDSE se pueden modificar fácilmente dependiendo de las necesidades del analista, aumentando la versatilidad de este tipo de técnica de preparación de muestras.

El dispositivo D1 se seleccionó para su utilización como dispositivo giratorio, debido a que presenta una buena recuperación en comparación con otros diseños, además de que su tamaño es menor, por lo que se requeriría menor volumen de eluyente, para lograr el contacto del disco con el eluyente.

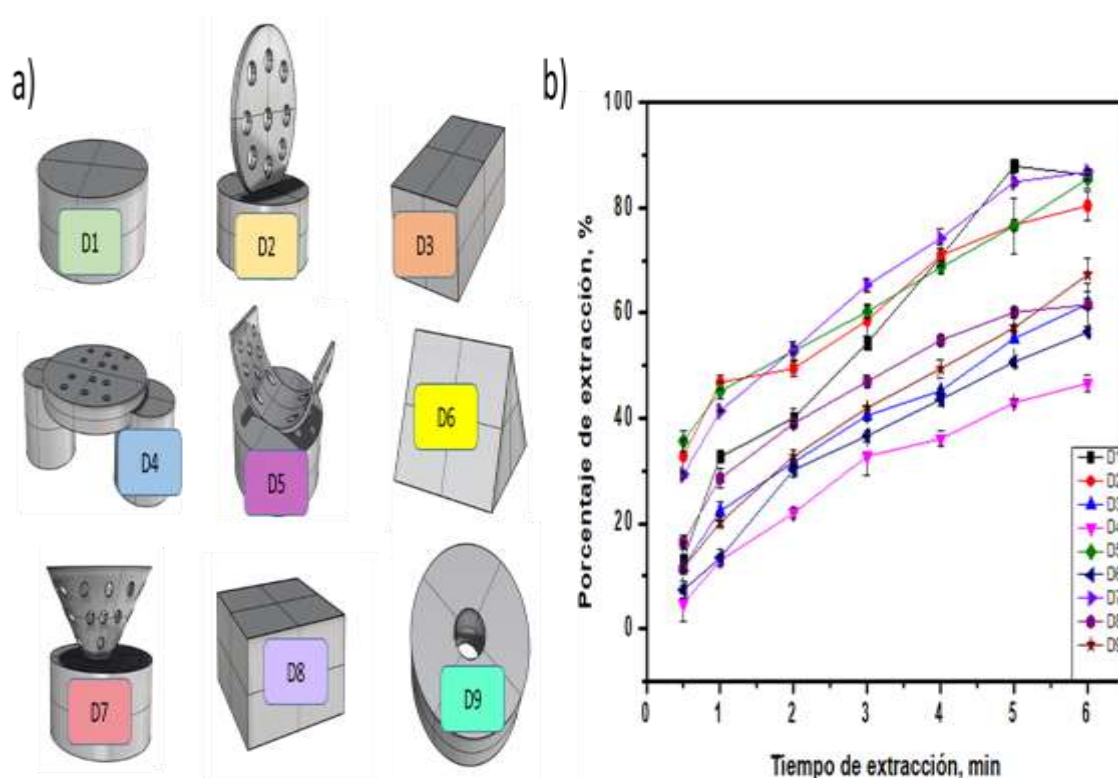


Figura 31. Evaluación del efecto de la geometría de los dispositivos en RDSE. a) 9 diseños de dispositivos impresos 3D para RDSE. b) Evaluación de la geometría de los dispositivos aplicados en RSDE

8.3.2 Selección de las variables de la extracción

Para demostrar la aplicabilidad de los dispositivos RDSE impresos 3D, se propuso la foto-inmovilización de un disco quelante en dispositivo rotatorio impreso 3D para la preconcentración de metales traza. Las pruebas iniciales se llevaron a cabo en las siguientes condiciones: la disolución utilizada como muestra contenía $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada metal en un medio de 0.1 mol L^{-1} de acetato de amonio, se utilizaron un volumen de muestra y de eluyente de 10 mL, y la velocidad de agitación para ambas etapas fue de 500 rpm. El sistema de detección fue el ICP-OES, y en la Tabla 21 se presentan las líneas de emisión seleccionadas para la cuantificación de metales. Estas líneas seleccionadas se resaltan en color azul y fueron establecidas en base a los datos obtenidos para su curva de calibración en un rango de $10\text{-}1500 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos los elementos analizados.

Tabla 21. Selección de las líneas de emisión ICP-OES para la detección de los metales

<i>Elemento</i>	<i>Curva de calibración</i>			<i>Elemento</i>	<i>Curva de calibración</i>		
	<i>Línea</i>	<i>Pendiente</i>	<i>R²</i>		<i>Línea</i>	<i>Pendiente</i>	<i>R²</i>
Ba	233.527	57.411	0.9998	Mn	257.61	219.96	0.9997
	455.403	3681.5	0.9997		259.372	349.53	0.9998
	493.408	1145.07	1		260.568	191.89	0.9997
	230.425	67.19	0.9997		294.92	109.98	0.9999
Be	313.107	1628.4	0.9997	Pb	403.075	15.606	0.9993
	313.042	3215.5	0.9997		220.353	2.743	0.9999
	234.861	372.6	0.9998		Ni	231.604	18.001
Bi	223.061	2.2476	0.9996	221.648		12.364	0.9997
	190.171	1.0699	0.9997	341.476		7.3404	0.9999
Cd	228.802	20.544	0.9999	227.022	11.615	0.9997	
	214.44	62.02	0.9996	Sr	407.771	9099.9	0.9998
	226.502	63.863	0.9993		421.552	3885.6	0.9999
Cr	267.716	46.549	0.9998	Ti	460.733	171.2	0.9989
	205.56	21.354	0.9998		334.94	232.89	0.9999
	283.563	55.881	0.9998		336.121	129.2	0.9998
	357.869	23.514	0.9998		337.279	224.52	0.9999
	206.158	19.977	0.9998		334.903	85.356	0.9998
Co	228.616	15.755	0.9998	V	368.519	70.257	0.9999
	238.892	42.273	0.9995		290.88	41.365	0.9997
	230.786	17.633	0.9998		309.31	---	---
	231.16	11.248	0.9998		292.402	64.708	1
Cu	327.393	41.847	0.9997	311.071	71.708	0.9997	
	324.752	106.47	0.9999	270.093	7.2091	0.9998	
Mg	285.213	134.2	0.9998				
	280.271	834.82	0.9999				
	279.553	2030.7	0.9998				

Se evaluaron los tiempos de curado entre 0-4 h, con intervalos de 30 min, antes de estudiar los diferentes parámetros implicados en la extracción de los metales utilizando los dispositivos RDSE impresos 3D. El disco quelante requiere un tiempo de curado de

sólo 60 min para la robusta foto-inmovilización del disco. Esta información se encuentra descrita ampliamente en la **sección 4.7 Foto-inmovilización del disco sorbente**.

El tiempo de extracción es una de las variables con mayor influencia en el sistema propuesto, esta variable se estudió en un rango de 20-1400 min (Figura 32). El porcentaje de extracción se utilizó como respuesta para este estudio, calculándose a partir de una lectura inicial sin preconcentración y dividiéndose entre la lectura utilizando preconcentración. Los porcentajes globales de los metales extraídos aumentaron al aumentar el tiempo de extracción de 20 a 360 min, en cambio no se observó un aumento significativo adicional para los tiempos de extracción más grandes. Por lo tanto, se seleccionó como tiempo de extracción 360 min, para lograr el mayor porcentaje de retención para los 14 metales analizados.

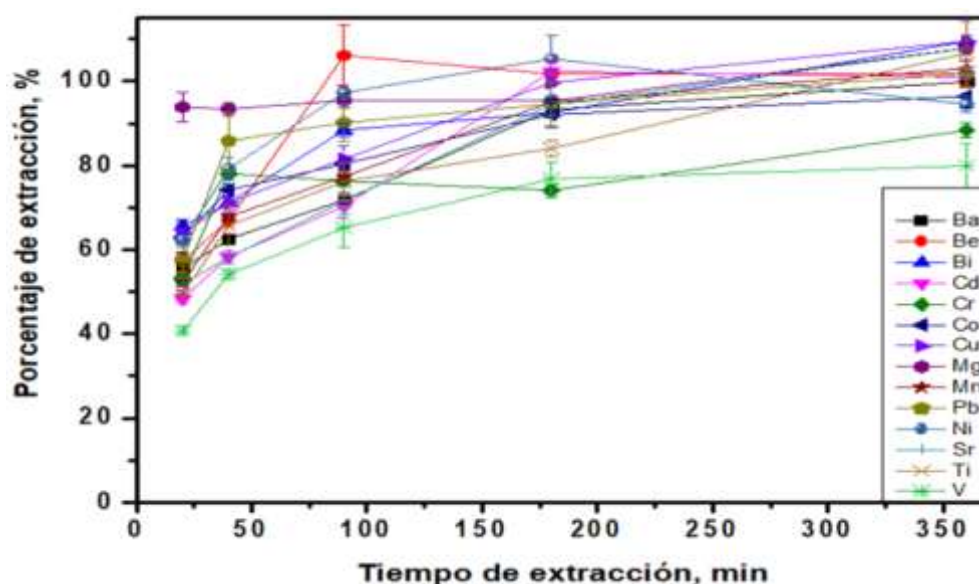


Figura 32. Optimización del tiempo de extracción para los 14 elementos analizados por el método propuesto

El efecto del volumen de eluyente se estudió en el rango de 1-10 mL, siendo 1 mL, el volumen mínimo para que el líquido estuviese en contacto con el material adsorbente adherido al dispositivo rotatorio impreso 3D. En la figura 33a se muestra que el volumen óptimo es 2 mL de eluyente para lograr una elución eficiente de los metales seleccionados; también se puede observar un efecto negativo en el rendimiento de la extracción utilizando mayores volúmenes de eluyente, provocado por el proceso de dilución del eluato, obteniéndose menor señal analítica.

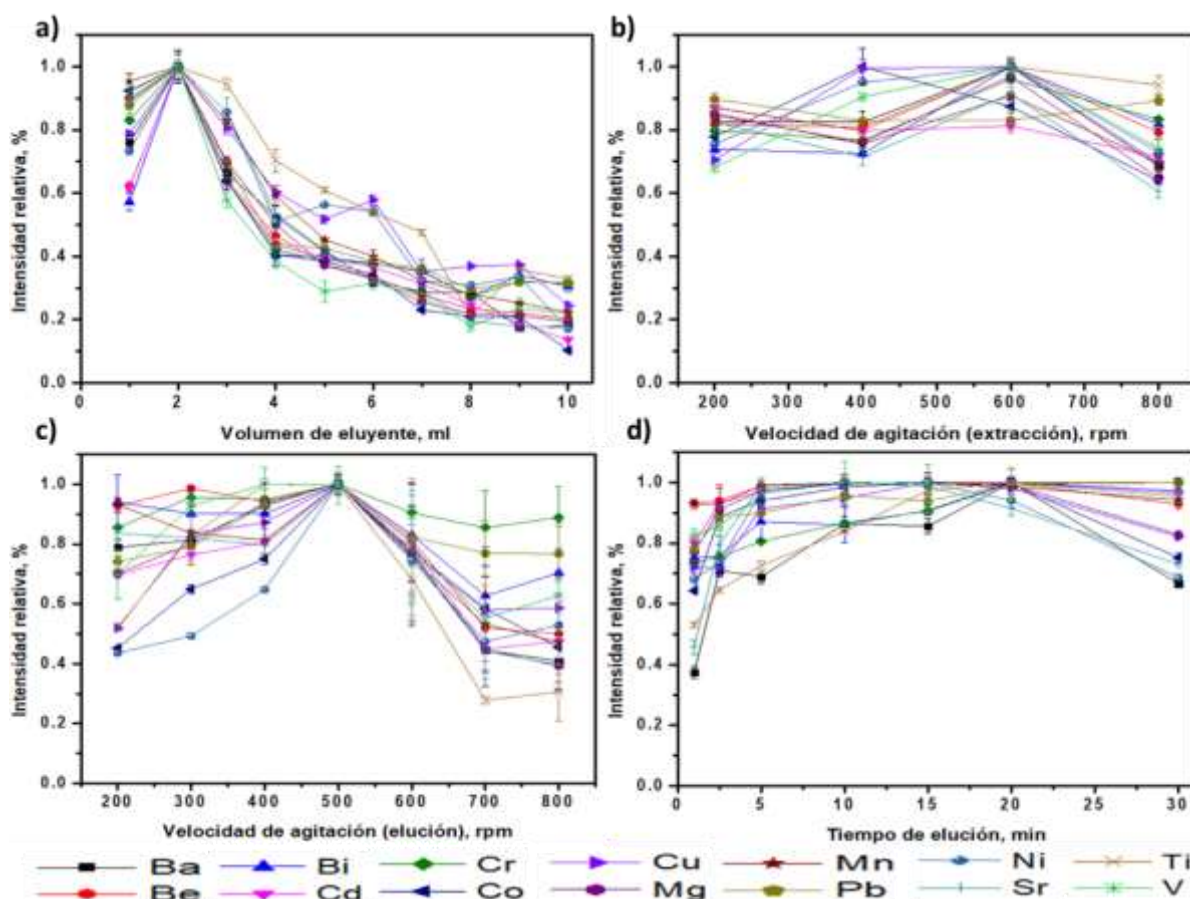


Figura 33. Efecto de las variables que influyen en la señal analítica para la preconcentración multielemental. Efecto del volumen de eluyente (a), la velocidad de agitación para la extracción (b), la velocidad de agitación para la elución (c) y el tiempo de elución (d)

La Figura 33b muestra el efecto de la velocidad de agitación en la extracción de metales evaluada en un rango de 200-800 rpm, lográndose los mejores resultados en el rango de 400-600 rpm. Con la finalidad de asegurar el mayor contacto con la muestra, se seleccionó el valor de 600 rpm para experimentos adicionales. Respecto a la velocidad de agitación en la etapa de elución, también se evaluó en el intervalo de 200-800 rpm. Como se muestra en la Figura 33c, el valor máximo de intensidad relativa se obtuvo con 500 rpm para todos los elementos, seleccionando este valor para posteriores experimentos. Además, se observa una disminución en la precisión a velocidades más altas, causado por el poco contacto del material adsorbente con pequeños volúmenes de eluyente.

El tiempo de elución es una variable primordial para obtener la señal más alta en la técnica de RDSE, y se estudió en el rango de 1-30 min. La Figura 33d muestra que esta variable tiene un efecto positivo sobre la señal analítica, es decir, el rendimiento de elución se incrementa respecto al tiempo de elución, pero este comportamiento sólo se observa hasta un tiempo de 20 minutos; en cambio, para tiempos más largos, se obtienen intensidades relativas similares o más bajas, por lo que se seleccionó como valor óptimo 20 min para experimentos adicionales.

8.3.3 Parámetros analíticos

Las características analíticas para el método RDSE desarrollado utilizando dispositivos impresos 3D se muestran en la Tabla 22. Los límites de detección (LOD) se calcularon como tres veces la desviación estándar de diez repeticiones del blanco dividido por la pendiente de la curva de calibración, los límites obtenidos se encontraron dentro del rango de 0.03-1.27 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los rangos lineales dinámicos se establecieron entre 0.1-200 $\mu\text{g L}^{-1}$. La precisión intra-día e inter-día se calcula como RSD (%). La precisión intra-día se obtuvo para dos niveles (10 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$), utilizando 10 extracciones consecutivas. Los valores obtenidos están dentro del rango de 3.8-7.7% (nivel menor, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) y 2.4-7.4% (nivel mayor, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Se estudió la precisión inter-día a un nivel de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando 5 diferentes dispositivos RDSE impresos 3D en 5 días diferentes, sin observar diferencias apreciables en la reproducibilidad inter-día, esto se deduce de las precisiones obtenidas (2.7–8.3%). Estos resultados confirman la alta reproducibilidad para la fabricación de dispositivos RDSE impresos 3D para la extracción de metales.

Los resultados de precisión obtenidos con el método propuesto son semejantes a la precisión obtenida usando dispositivos 3D en formato de columna para retener metales traza [123], y también respecto a la extracción de metales usando discos quelantes con detección de ICP-MS [179]. Los LOD y la sensibilidad obtenidos para este trabajo son mejores en comparación con trabajos previos sobre extracción multielemental utilizando carbón activado o resinas quelantes combinadas acopladas a la detección por ICP-OES [180,181]. Cabe recalcar la cantidad de metales (14 metales) que se pueden retener simultáneamente utilizando los dispositivos impresos 3D a través de la técnica de RDSE.

Tabla 22. Características analíticas obtenidas mediante la técnica de disco inmovilizado RDSE para la determinación de 14 metales

Elemento	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Sensibilidad (CPS/ $\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	RSD Intra-día (%), 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ n=10	RSD Intra-día (%), 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ n=10	RSD Intra-día (%), 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ n=5	EF
Ba	0.13	0.44-200	20564	0.9988	7.5	4.7	6.7	5
Be	0.09	0.29-200	20954	0.9990	5.1	2.4	2.7	7
Bi	1.27	4.24-200	9.48	0.9984	8.5	7.4	8.3	3
Cd	0.06	0.21-200	658.10	0.9992	4.8	3.0	4.2	9
Cr	0.30	0.99-200	229.81	0.9997	7.5	4.9	6.8	3
Co	0.26	0.87-200	440.81	0.9991	4.6	3.8	4.5	8
Cu	0.20	0.68-300	820.43	0.9996	4.9	2.8	3.9	8
Mg	0.09	0.28-200	11380	0.9991	4.9	3.7	4.8	4
Mn	0.05	0.15-200	2603.40	0.9998	5.4	4.4	4.5	6
Pb	0.26	0.88-200	27.78	0.9994	3.8	3.2	3.6	3
Ni	0.26	0.86-200	187.74	0.9991	5.7	3.7	4.8	8
Sr	0.03	0.10-200	49516	0.9996	4.9	3.8	4.4	8
Ti	0.77	2.58-200	1277.30	0.9990	7.7	6.7	6.8	7
V	0.56	1.88-200	378.29	0.9994	5.4	5.0	5.7	4

Los factores de enriquecimiento (EF) se calcularon a partir de la relación de las intensidades de la señal antes y después de la preconcentración. En las condiciones experimentales seleccionadas, se obtuvieron EF en el rango de 3-9, lo que demuestra su uso en la limpieza de muestra. Además, los dispositivos impresos 3D para RDSE desarrollados también son útiles para la preconcentración de la muestra. La comparación del método RDSE con la inyección directa de las disoluciones estándar se muestra en la Tabla 23.

El volumen de muestra se evaluó en el rango de 10-120 mL utilizando dos diferentes tiempos para el proceso de extracción (6 y 24 h) fijando la cantidad de masa en 100 μg de cada elemento para esta prueba. Como se muestra en la Figura 34, con 20 mL de volumen de muestra se logra una buena señal analítica y se pueden obtener mejores LODs, por lo que fue el valor seleccionado para alcanzar las características analíticas. La respuesta disminuye conforme aumenta el volumen debido a que se tiene mayor volumen de movimiento y afecta la interacción del analito con el adsorbente.

Tabla 23. Características analíticas para la extracción de metales antes y después de la extracción mediante la técnica RDSE

Elemento	Directo			RDSE		
	Sensibilidad (CPS/ $\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	Sensibilidad (c.p.s)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2
Ba	3681.40	1.10	0.9992	20564.00	0.13	0.9988
Be	3801.50	0.92	0.9991	20954.00	0.09	0.9990
Bi	2.67	33.92	0.9993	9.48	1.27	0.9984
Cd	91.84	1.13	0.9995	658.10	0.06	0.9992
Cr	71.63	1.90	0.9999	229.81	0.30	0.9997
Co	55.34	2.10	0.9993	440.81	0.26	0.9991
Cu	113.62	1.72	0.9991	820.43	0.20	0.9996
Mg	2505.70	1.86	0.999	11380.00	0.09	0.9991
Mn	440.49	0.91	0.9993	2603.40	0.05	0.9998
Pb	5.21	13.26	0.9996	27.78	0.26	0.9994
Ni	23.45	4.85	0.9997	187.74	0.26	0.9991
Sr	9883.30	0.98	0.9994	49516.00	0.03	0.9996
Ti	257.58	1.27	0.9991	1277.30	0.77	0.9990
V	84.21	1.82	0.9998	378.29	0.56	0.9994

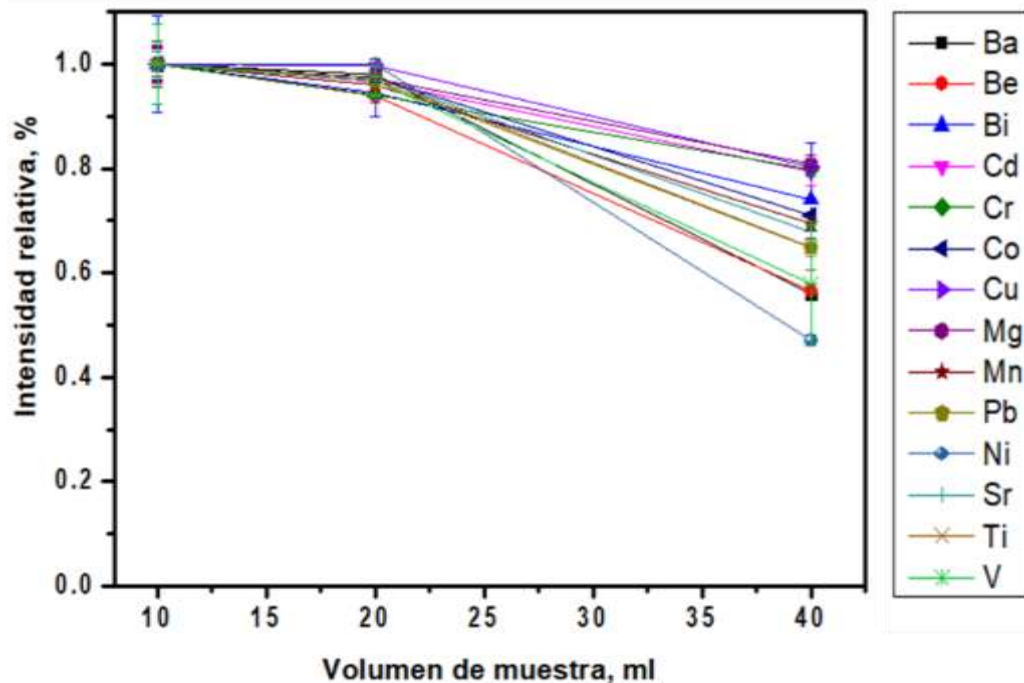


Figura 34. Efecto del volumen de muestra utilizando el método propuesto

La resina fotoactiva utilizada para la impresión de los dispositivos se basa en monómeros de acrilato, estos compuestos pueden retener algunos de los metales analizados, como Mn, Ni, Zn, Cu, Cd y Pb [123]. Por lo tanto, la contribución del material impreso en 3D para la extracción de los metales seleccionados en este trabajo se evaluó realizando la extracción RDSE con las condiciones experimentales del método propuesto pero sin el disco quelante. La contribución del material impreso 3D fue <5%.

8.3.3 Análisis de muestras

La validación del método propuesto se llevó a cabo analizando un material de referencia certificado de aguas residuales con código SPS-WW2 lote 106 (National Institute of Standard and Technology) y un material de referencia certificado de suelo denominado loamy clay 1- CRM052 (ANSI-ASQ National Accreditation Board). La muestra de agua se analizó directamente a pH 5.3 (acetato de amonio 0.1 mol L^{-1}). En cambio, la muestra de suelo se digirió y el proceso utilizado para el tratamiento de muestra se basó en el método 3051A (SW-846): digestión ácida asistida por microondas para sedimentos, lodos, suelos y aceites de la EPA, procedimiento que se describe a continuación: se pesaron 0.5 g de muestra por triplicado en los recipientes de digestión, se agregaron 9 mL de ácido nítrico (65%) y 3 mL de ácido clorhídrico (37%). Las muestras se digieren con un proceso de temperatura que consiste en una rampa de elevación de hasta $175 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5.5 min y manteniendo la temperatura a $175 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Se utilizó un sistema de digestión por microondas Multiwave GO (Anton Paar, Austria). El producto de la digestión se diluyó a 100 mL con agua, luego se tomó una alícuota adecuada dentro del rango lineal de trabajo para la determinación de los metales con el método propuesto, se ajustó a pH 5.3 con 0.1 mol L^{-1} de acetato de amonio para llevar a cabo la preconcentración.

Para el análisis de las muestras se realizaron tres réplicas, se utilizó un volumen de muestra de 20 mL y para lograr la determinación del Mg se utilizó un factor de dilución más alto en relación con los metales restantes. Los resultados obtenidos con el método propuesto se muestran en la Tabla 24. De acuerdo a la prueba t para el método de comparación de medias, estos resultados no mostraron diferencias significativas en un nivel de confianza del 95% en comparación con los valores certificados.

Tabla 24. Validación del método propuesto basado en RDSE con dispositivo impreso 3D analizando materiales de referencia certificados

	CRM052 (Suelo arcilloso 1)			SPS-WW2 batch 106 (Agua residual)		
	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Obtenido (mg kg ⁻¹)	Error (%)	Valor certificado (µg L ⁻¹)	Obtenido (µg L ⁻¹)	Error (%)
Ba	238± 6	244 ± 10	2.3	---	---	
Be	105± 3	107 ± 9	1.4	---	---	
Cd	256 ± 7	245 ± 10	-4.3	100 ± 1	95.0 ± 8	-5
Cr	334 ± 4	342 ± 8	2.3	1000 ± 5	992.1 ± 8	-0.8
Co	68 ± 2	64 ± 8	-5.9	300 ± 2	303 ± 7	1.0
Cu	131 ± 3	1332.9 ± 5	1.5	2000 ± 10	2018 ± 36	0.9
Mg	8850 ± 243	8970 ± 385	0.2	---	---	
Mn	572 ± 40	513 ± 45	-1.0	2000 ± 10	2021 ± 16	1.1
Pb	108 ± 3	106 ± 5	2.3	500 ± 3	507 ± 6	1.4
Ni	395 ± 10	376 ± 16	-4.9	5000 ± 25	5032.1 ± 33	0.6
Sr	127 ± 15	119 ± 16	-6.3	---	---	
Ti	58.5 ± 7	63 ± 8	7.0	---	---	
V	279 ± 4	286 ± 5	2.7	500 ± 3	491 ± 8	-1.8

Para la muestra certificada de suelo que contiene 14 elementos, los errores relativos encontrados entre los valores certificados y medidos fueron inferiores al 5%, excepto para Co (-5.9%), Sr (-6.3%) y Ti (7.0%). En el caso de la muestra certificada de aguas residuales que contiene 8 elementos, el error relativo en la medición de Cd fue del 5% y en el resto de elementos se obtuvieron errores menores al 1.8%.

Se evaluó la aplicabilidad del método desarrollado para analizar muestras ambientales y corroborar su versatilidad a través del análisis de tres lixiviados de una planta de tratamiento de residuos sólidos y una muestra de agua subterránea recolectada cerca de la planta de tratamiento antes mencionada. Todas las muestras fueron tomadas de diferentes lugares en Mallorca, España. Las muestras se analizaron directamente, después se enriquecieron con una concentración de 10 µg L⁻¹ de cada uno de los metales seleccionados (pH 5.3, volumen de muestra 20 mL) para nuevamente ser analizadas.

La Tabla 25 muestra los resultados obtenidos usando el método de adición-recuperación aplicado para las muestras de lixiviado y de agua subterránea. Los elementos Ba, Bi, Mn y Cu se detectaron en el agua subterránea en un nivel de µg L⁻¹, mientras que Mg y Sr se detectaron en el nivel de mg L⁻¹. Después de inyectar la muestra de agua subterránea, se obtuvieron recuperaciones satisfactorias entre 91-106%. Los metales seleccionados, excepto Co, Pb y Ti, se detectaron en al menos uno de los

lixiviados analizados. Los resultados de recuperación también fueron satisfactorios para los diferentes lixiviados analizados, con recuperaciones entre 91-108%.

Tabla 25. Análisis de muestras de agua utilizando el dispositivo RDSE impreso 3D

	Agua subterránea			Lixiviado 1		Lixiviado 2		Lixiviado 3	
	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Medido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)	Medido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)	Medido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)	Medido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)
Ba	0	6.9 ± 1.1		6.6 ± 0.4		6.5 ± 0.4		2.4 ± 0.3	
	10	16.7 ± 0.2	99	16.8 ± 0.4	101	17.9 ± 0.5	108	12.2 ± 0.1	99
Be	0	< LOD		< LOD		< LOD		0.8 ± 0.05	
	10	10.1 ± 0.2	101	9.5 ± 1.1	95	10.3 ± 0.2	93	9.8 ± 1.4	91
Bi	0	14.7 ± 0.1		23.6 ± 1.6		26.0 ± 1.9		24.5 ± 1.2	
	10	24.8 ± 0.2	101	31.1 ± 2.3	93	35.7 ± 1.4	99	34.8 ± 0.9	101
Cd	0	< LOD		< LOD		0.5 ± 0.03		0.6 ± 0.01	
	10	9.4 ± 0.2	94	9.7 ± 0.5	97	9.6 ± 0.2	91	9.8 ± 0.8	93
Cr	0	< LOD		7.7 ± 1.8		14.9 ± 0.2		< LOD	
	10	9.9 ± 0.2	99	18.7 ± 1.2	106	23.0 ± 0.7	92	9.4 ± 0.1	94
Co	0	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD	
	10	9.6 ± 0.3	96	9.1 ± 0.6	91	9.3 ± 0.2	93	9.8 ± 0.3	98
Cu	0	9.9 ± 1.7		3.4 ± 0.2		9.1 ± 0.7		< LOD	
	10	19.7 ± 0.3	99	13.3 ± 2.1	99	20.6 ± 1.9	108	9.3 ± 1.4	93
Mg	0	2095 ± 16		1462 ± 16		1459 ± 26		1055 ± 15	
	10	2212 ± 4	106	1587 ± 3	108	1474 ± 10	100	995 ± 17	94
Mn	0	2.3 ± 0.2		< LOD		2.4 ± 0.2		3.9 ± 0.1	
	10	11.6 ± 0.2	94	9.2 ± 1.0	92	11.2 ± 1.2	91	12.8 ± 0.8	92
Pb	0	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD	
	10	9.5 ± 0.3	95	9.6 ± 0.5	96	10.1 ± 0.7	102	10.1 ± 1.1	101
Ni	0	< LOD		< LOD		< LOD		3.1 ± 0.9	
	10	9.7 ± 0.2	97	9.4 ± 0.4	94	9.3 ± 0.1	93	12.1 ± 0.2	92
Sr	0	432.0 ± 8		1037 ± 53		342 ± 3		263 ± 3	
	10	440 ± 7	100	1048 ± 35	100	367 ± 6	104	278 ± 2	102
Ti	0	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD	
	10	9.1 ± 0.4	91	9.4 ± 0.6	94	10.7 ± 0.9	102	9.5 ± 0.9	95
V	0	< LOD		10.0 ± 0.3		1.8 ± 0.1		2.4 ± 0.2	
	10	9.6 ± 0.8	96	18.6 ± 0.1	93	11.2 ± 1.0	95	11.8 ± 0.1	95

Lixiviado 1. pH : 7.53; conductividad: 1108; sólidos en suspensión: 72.8 mg L^{-1} ; DQO: 90.5 mg L^{-1} ; DBO5: 42.0 mg L^{-1} . **Lixiviado 2.** pH: 7.76; conductividad: 1942; sólidos en suspensión: 63.0 mg L^{-1} ; DQO: 86.7 mg L^{-1} ; DBO5: 34.0 mg L^{-1} . **Lixiviado 3.** pH: 9.59; conductividad: 1925; sólidos en suspensión: 91.2 mg L^{-1} ; DQO: $109,7 \text{ mg L}^{-1}$; DBO5: 13.1 mg L^{-1} .

8.4 Conclusiones

Se ha desarrollado una estrategia simple y eficiente para la foto-inmovilización de discos adsorbentes en dispositivos impresos 3D, sin la necesidad de utilizar adhesivos adicionales con durabilidad limitada en medio ácido. Como prueba de la aplicabilidad y versatilidad de esta técnica de inmovilización, se utilizó exitosamente en la fabricación de dispositivos giratorios impresos 3D basados en la técnica RDSE.

Los dispositivos giratorios diseñados mantienen las características intrínsecas de RDSE, como una mayor eficiencia de extracción, buena reproducibilidad y mejoras en los límites de detección. Además, la geometría del RDSE se puede adaptar fácilmente a los requerimientos del análisis. La combinación de RDSE con dispositivos impresos 3D mostró un buen rendimiento para la extracción simultánea de 14 metales en muestras de matriz complejas utilizando como técnica de detección ICP-OES.

El procedimiento desarrollado se puede extender a otras aplicaciones utilizando diferentes discos adsorbentes disponibles comercialmente, abriendo nuevas aplicaciones para la preparación de muestras para matrices complejas. El enfoque no se limita a los discos comerciales, también se puede aplicar a discos fabricados en laboratorio, basados en materiales menos convencionales que puedan foto-inmovilizarse en dispositivos impresos 3D.

CAPÍTULO 9

Tendencias actuales de la extracción en fase sólida automatizada en flujo

9.1 Resumen

El pretratamiento de muestras es una temática recurrente en el análisis químico, especialmente para su aplicación en muestras ambientales con el propósito de poder cuantificar los contaminantes de forma adecuada y eliminar las interferencias. Para ello es necesario conocer el estado del arte de una de las principales técnicas de pretratamiento, es decir, la extracción en fase sólida (SPE). Otras de las tendencias es el poder automatizar esta técnica mejorando las características analíticas de los métodos, para lo que se recurre a las técnicas de análisis en flujo.

La revisión bibliográfica descrita en este capítulo se discute y se analiza críticamente. Se hizo una revisión de las aplicaciones de la SPE automatizada basada en técnicas de análisis en flujo desarrolladas recientemente, incluyendo nuevas tendencias en la generación de nuevos materiales adsorbentes y nuevas tecnologías de fabricación de soportes, enfatizando sus ventajas y limitaciones que se tienen al momento de su implementación.

El progreso de la extracción automática en fase sólida llevada a cabo en flujo está ligado al desarrollo de nuevos materiales y técnicas de fabricación para construir dispositivos SPE mejorados, lo cual es crucial para avanzar en este campo. La fabricación aditiva (impresión 3D) ofrece enormes ventajas en comparación con las técnicas de fabricación convencionales, lo que permite la fabricación rápida y eficiente de dispositivos SPE con estructura compleja. Además, los materiales novedosos y los soportes de SPE menos convencionales también han surgido como alternativas interesantes para la SPE automatizada, como partículas magnéticas, dispositivos de extracción con agitación, membranas / discos y soportes monolíticos. La Figura 35 muestra una línea de tiempo de los principales desarrollos realizados en SPE automatizada basada en flujo en los últimos 5 años.



Figura 35. Línea de tiempo de los desarrollos recientes en la SPE automatizada

9.2 Impresión 3D

El desarrollo de dispositivos impresos 3D para la SPE está basado en el diseño de soportes de extracción que retienen adsorbentes comerciales, o utilizando la resina polimerizada (material impreso) como adsorbente para la SPE. Las resinas utilizadas para la impresión 3D son principalmente polímeros basados en acrilato, la resina polimerizada se ha empleado como adsorbente para la extracción de metales en forma simultánea (Figura 36a y Figura 36b) [123]. En dicho trabajo, se fabricó un preconcentrador completamente impreso 3D con una estructura compleja, la cual estaba integrada dentro del dispositivo y que está basada en una red de cubos interconectados, esta configuración permite aumentar el área efectiva mejorando la transferencia de los analitos. La técnica de estereolitografía (SLA) fue utilizada para la fabricación del preconcentrador [123]. El sistema de extracción propuesto está automatizado utilizando la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA), la cual se acopló con un dispositivo impreso 3D con estructura de cubos integrada para extraer directamente los metales (Mn, Ni, Zn, Cu, Cd y Pb) sobre el polímero impreso 3D. La detección de metales se logró a través de la combinación del sistema FIA con ICP-MS (Figura 36a). La extracción directa de los metales con el dispositivo impreso 3D mostró bajos límites de detección, una alta eficiencia de extracción, tolerancia al medio altamente salino y permitió el uso de altos caudales durante la extracción.

En diversos estudios se ha reportado la generación de dispositivos impresos 3D, con la finalidad de utilizarlos como soportes de materiales comerciales para la preconcentración de metales. En un primer ejemplo, se fabricó un sistema de flujo impreso 3D para la extracción y determinación de plomo, el sistema consistía en 3 diferentes piezas impresas utilizando SLA [182]. Las piezas que conformaban el sistema microfluídico son: 1) un soporte para la resina de extracción en forma de columna, 2) un reactor - mezclador para llevar a cabo una reacción colorimétrica y 3) una unidad de detección que incluye una celda de flujo para combinarla con un espectrofotómetro. El sistema de SPE automatizada se implementó con la combinación de la técnica MPFS para el manejo de líquidos, una resina comercial (Pb resin) dentro del dispositivo impreso 3D para la retención de plomo y la reacción de plomo con 4-(2-piridilazo)-resorcinol, para la determinación espectrofotométrica en muestras de agua, reacción que se llevó a cabo después de la extracción. La combinación de la técnica MPFS con el dispositivo impreso

3D permitió disminuir el límite de detección para la determinación de plomo, y a su vez se obtuvo un analizador portátil y de bajo costo.

Calderilla, et al. [171] desarrollaron un dispositivo modular impreso 3D usando SLA para la SPE automatizada. En este caso el dispositivo se diseñó para la especiación, preconcentración y derivatización de hierro. El método analítico se automatizó utilizando la técnica MSFIA con detección espectrofotométrica (Figura 36c). El dispositivo impreso 3D consistió en dos partes que se pueden unir a través de una rosca, de las cuales la primera parte contenía un mezclador y dos puntos de confluencia para la introducción de reactivos. El primer punto de confluencia estaba colocado previo al mezclador, en el cual se llevó a cabo la oxidación de Fe (II) a Fe (III) usando H_2O_2 como oxidante, y el segundo punto de confluencia estaba situado después del mezclador, y se utilizó para inyectar el eluyente. La segunda parte del dispositivo se diseñó con el propósito de obtener un soporte para el disco adsorbente, además contenía un punto de confluencia previo al mezclador para introducir el reactivo complejante; en este punto se mezclaba el eluato con el reactivo cromogénico, para después continuar el flujo hacia un mezclador que se utilizaba para aumentar el rendimiento de la reacción, consecutivamente el producto de la reacción se enviaba hacia el detector. Los mezcladores en ambas partes se basaban en cubos que forman redes interconectadas, este diseño se muestra en la Figura 36d. El dispositivo impreso 3D reemplazó los elementos típicos de las redes de flujo, como las tuberías y conectores utilizadas comúnmente en técnicas de análisis en flujo, obteniendo un dispositivo monolítico con diferentes elementos integrados.

Siguiendo la misma línea de investigación, se fabricó un dispositivo impreso 3D similar al descrito anteriormente, el cual contenía un disco adsorbente para la preconcentración y determinación de cromo (VI) en muestras de agua [183]. En este ejemplo, se seleccionó un disco de poli(estireno-divinilbenceno) sulfonado de fase inversa (SDB-RPS) como disco para retener el complejo Cr (III) - 1, 5-difenilcarbazona, formado a partir de la reacción de Cr (VI) con 1, 5 difenilcarbazona. Se usó una disolución ácida / metanol como eluyente. Un aspecto relevante es el efecto de los disolventes orgánicos sobre la durabilidad del dispositivo impreso 3D, aspecto que se abordó en el citado estudio, concluyéndose que el uso de hasta un 80% de metanol en el eluyente no presentaba ningún daño prematuro en el dispositivo utilizado para la extracción del complejo de Cr (VI).

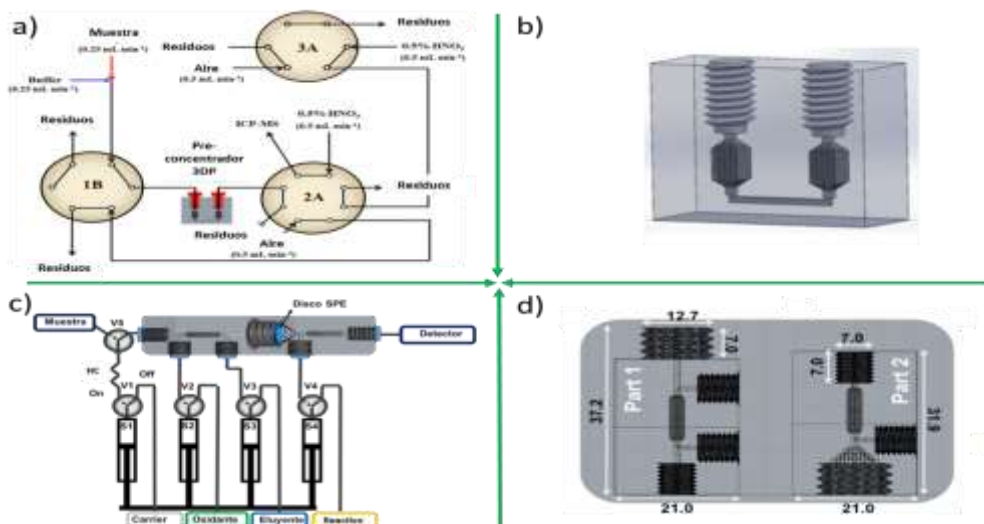


Figura 36. Dispositivos SPE impresos 3D acoplados a técnicas de análisis en flujo. a) Sistema FIA- dispositivo impreso 3D para la extracción de metales traza; b) Preconcentrador impreso 3D; c) Sistema MSFIA- dispositivo impreso 3D para SPE basada en disco; d) Dispositivo impreso 3D para SPE basada en disco (dimensiones en mm). (a,b) Adaptación de la referencia [123] con permiso de Elsevier.

Los formatos Lab-on-Paper (LOP) [184] y Lab-on-Valve (LOV) [185] han evolucionado hacia plataformas impresas 3D, que se pueden adaptar a estos tipos de formatos. Se ha realizado un estudio para fabricar un LOV impreso 3D evaluando diferentes técnicas de impresión, siendo evaluadas las técnicas la tecnología Polyjet, SLA y el procesamiento digital de la luz (DLP) [186]. La técnica DLP fue seleccionada para imprimir el dispositivo LOV, ya que con esta técnica de fabricación se obtenían los canales de flujo con una superficie más lisa, en comparación con las otras técnicas evaluadas. También, la técnica DLP permitió la impresión 3D de un bucle de reacción integrado dentro del dispositivo, sin presentar obstrucción dentro de los canales del LOV impreso.

Para obtener un sistema automatizado se montó la LOV impresa 3D en una válvula de selección acoplada a la técnica MSFIA, realizando la detección mediante fluorescencia atómica. El sistema desarrollado se aplicó para la preconcentración simultánea de plomo y cadmio en muestras de agua, utilizando una combinación de dos resinas comerciales (Pb resin y Amberlite® IRC748). Se ha reportado también el desarrollo de un sistema de inyección de microflujo impreso 3D montado sobre una válvula de selección. Dentro del diseño se incorporó una microcolumna para almacenar el

material extractante (partículas magnéticas) que se utiliza para la extracción del analito. El montaje se acopló a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la extracción, separación y determinación de antimicrobianos [187].

La tecnología LOP surgió debido a la necesidad de plataformas de diagnóstico más baratas, portátiles y robustas [188]. Granica, et al. (2018) [189] desarrolló un soporte impreso 3D utilizando la técnica de modelado por deposición fundida (FDM); se diseñó y se construyó un sistema FIA en papel que estuviera dentro del dispositivo impreso 3D (Figura 37). La configuración desarrollada permite un flujo continuo de carrier, así como de muestra a través del dispositivo LOP. La incorporación de adsorbentes utilizando papel como soporte, podría ser interesante en un futuro para integrar alguna técnica de SPE en dispositivos LOP.

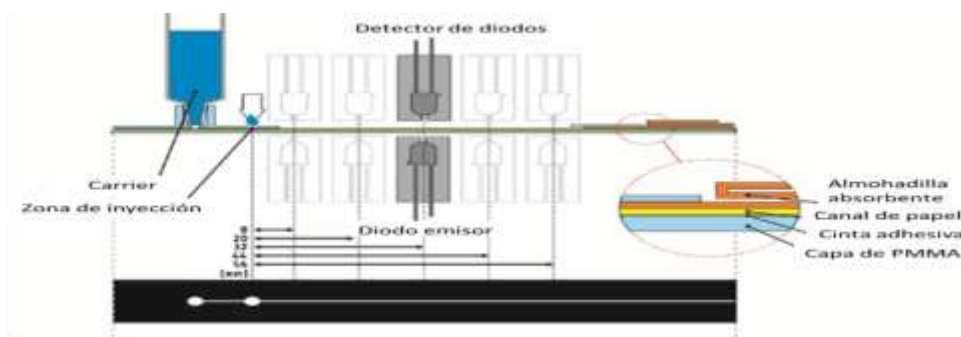


Figura 37. Dispositivo impreso 3D aplicado al sistema FIA-LOP. Adaptación de la referencia [184] con permiso de Elsevier.

Las muestras de composición compleja, tales como las de alto contenido salino o muestras de petróleo crudo y emulsiones, se han analizado utilizando dispositivos impresos 3D acoplados a técnicas de análisis en flujo y espectrometría de masas [121]. Para el pretratamiento de emulsiones de aceite crudo, se desarrolló un dispositivo impreso 3D a través de FDM, logrando la preconcentración de maltenos. La combinación de la técnica FIA con un dispositivo impreso 3D y GC-MS (o GC-FID), como sistema de separación y detección, logró una reducción del tiempo de pretratamiento, hasta de 10 veces menor con respecto a los métodos estándar. Además, se demostró la versatilidad y resistencia del material impreso 3D (ácido poliláctico) en relación al uso de disolventes no polares en los métodos analíticos. Respecto al pretratamiento de muestras con alto contenido salino, Su et al. (2018) propuso una minicolumna impresa 3D utilizando la técnica SLA. El sistema automático construido utilizó una resina comercial (BV-007,

Miicraft) para la extracción del analito, la cual contenía nanopartículas de TiO₂ [190]. La adición de TiO₂ en la resina mejoró la extracción de arsénico y selenio en muestras de agua y orina, explotando un sistema automático conformado por FIA-ICP-MS.

Los métodos automáticos desarrollados recientemente utilizando impresión 3D aplicados en SPE automatizada se resumen en la Tabla 26. Hasta el momento, las aplicaciones de impresión 3D para SPE se han enfocado principalmente a la determinación de especies inorgánicas, por lo tanto existe un número menor de métodos desarrollados para la determinación de compuestos orgánicos. Lo anterior se atribuye principalmente a la limitada estabilidad de los dispositivos impresos 3D frente al uso de disolventes orgánicos típicos como eluyentes en SPE. Sin embargo, se han publicado recientemente [183,187] las primeras aplicaciones que exploran la compatibilidad de eluyentes orgánicos con dispositivos impresos 3D.

Tabla 26. Aplicaciones de SPE automatizada utilizando dispositivos impresos 3D acoplados con técnicas de análisis en flujo

Absorbente SPE	Técnica impresión 3D	Técnica en flujo/Sistema de detección	Analito	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Aplicación	Ref.
Resina impresa (basada en acrilatos)	SLA	FIA-ICP-MS	Mn	0.0031	0.05-5	Muestras de agua de océano, estuario y río	[123]
			Ni	0.0019	0.05-5		
			Cu	0.0005	0.05-5		
			Zn	0.0180	0.05-5		
			Cd	0.0009	0.001-0.1		
			Pb	0.0003	0.001-0.1		
Partículas Pb-resin	SLA	MPFS-UV/Vis	Pb	2.7	3-120	Muestras agua natural	[182]
Disco quelante	SLA	MSFIA-UV/Vis	Fe (II)	3	9-800	Muestras de agua de río, pozo, residual y lixiviados	[171]
			Fe(III)	3	9-800		
Disco SDB-RPS	SLA	MSFIA-UV/Vis	Cr (VI)	0.5	1.6-300	Muestras de agua superficial, pozo y lixiviados	[183]
Pb-resin and Amberlite® IRC748	DLP	MSFIA-LOV-FLD	Pb	0.17	0.17-20	Muestras de agua natural	[186]
			Cd	0.2	0.2-15		
Partículas magnéticas recubiertas de polianilina	SLA	μ FIA-HPLC	Parabenos y Triclosan	1.1-4.5	5-2000	Muestras de orina y saliva	[187]
Resina impresa-nanopartículas de TiO ₂	SLA	FIA-ICP-MS	As	0.004-	0.1-10	Muestras de agua y orina humana	[190]
			Se	0.033	0.5-50		
				0.061-0.128			

9.3 Adsorbentes magnéticos

La extracción magnética en fase sólida (MSPE) [191] es un pretratamiento de muestra comúnmente utilizado y que está basado en la dispersión de un adsorbente magnético en el medio de muestra, en el cual después del tiempo de extracción requerido, el adsorbente magnético se recupera fácilmente separándolo de la matriz de la muestra utilizando un dispositivo externo con campo magnético. El mismo procedimiento se repite para el lavado del adsorbente y la elución del analito. Las ventajas principales de MSPE son:

- i. No requiere empaquetamiento de las partículas, ya que el material magnético se recupera fácilmente utilizando un campo magnético externo.
- ii. No se requieren pasos adicionales como la filtración y/o centrifugación después de la desorción del analito.
- iii. No se tiene un límite en el tamaño y la forma del adsorbente. Por lo tanto, favorece el uso partículas con un tamaño pequeño mejorando el área de extracción efectiva.

Con la finalidad de diversificar aún más las aplicaciones de MSPE, recientemente se han desarrollado diferentes métodos basados en técnicas en flujo para automatizar esta técnica (Tabla 26). Dentro de las principales ventajas que se puede lograr con la automatización de MSPE se pueden mencionar las siguientes: se evitan procedimientos manuales, y se minimiza la exposición y el manejo de los adsorbentes basados en nanopartículas. Los adsorbentes típicos para MSPE se basan en nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas directamente con grupos funcionales específicos, o con una cubierta del material de adsorción, de acuerdo al analito o al propósito del análisis.

Para mejorar la reproducibilidad y facilitar la regeneración del adsorbente magnético, Domínguez et al. [192] propuso un sistema automático basado en la técnica SIA para la determinación de insecticidas organofosforados utilizando nanopartículas magnéticas como material adsorbente (300 nm, Ademtech Kit) para SPE. El proceso de extracción se llevó a cabo dentro de una celda de flujo con agitación y se acopló a una detección electroquímica (Figura 38a). Se inmovilizó la enzima acetilcolinesterasa en las partículas magnéticas para lograr la retención del analito, el material recubierto se colocó dentro de una celda de flujo con rotación, en el montaje se combinó un imán y un motor de corriente continua. El sistema fue diseñado con el propósito de asegurar la reproducibilidad de la extracción y evitar la pérdida de partículas en el sistema.

Se diseñó otra configuración utilizando un reactor fluidizado, que está constituido por un tubo de politetrafluoroetileno de forma cilíndrica; este reactor se acopló a una combinación de técnicas de análisis en flujo (SIA-FIA) y a un dispositivo magnético para la retención del adsorbente magnético (Figura 38b). Se utilizaron nanopartículas magnéticas de Zr-Fe-C como material adsorbente, lográndose la automatización del método. Este sistema se aplicó a la determinación de fluoroquinolonas en muestras de alimentos para bebés usando como sistema de detección HPLC-FLD. Una de las características principales del sistema es el incremento en la interacción entre las partículas y el analito, ocasionado por el movimiento de burbujas de aire dentro del fluido, por lo que este tipo de sistemas no requieren de una agitación asistida para mejorar el rendimiento de la extracción [193].

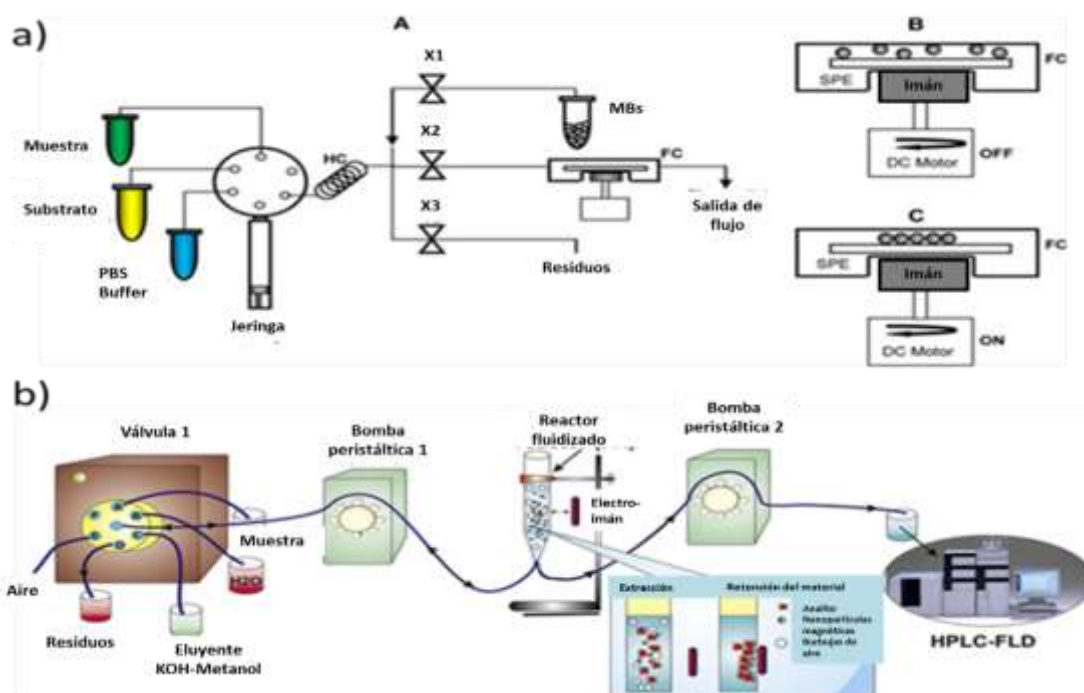


Figura 38. Pretratamientos automáticos utilizando partículas magnéticas. a) Configuración SIA-MSPE (A), Celda de flujo con motor apagado (B) y Celda de flujo con motor encendido (C). b) Extracción automatizada con reactor fluidizado. Adaptación de las referencias [192] y [193] con permiso de Elsevier.

La MSPE automatizada se puede llevar a cabo "en jeringa" utilizando cristales porosos de menor tamaño basados en la estructura metal-orgánica MIL-100, que a su vez se obtienen de la coordinación de Cr (III) con ácido trimésico [194]. La magnetización de

los cristales MIL-100 se llevó a cabo mediante el crecimiento de nanopartículas de Fe_3O_4 dentro de sus poros. La técnica MSFIA se ha utilizado para la automatización de métodos “en jeringa” usando una barra pequeña de agitación colocada dentro de la jeringa, la barra es agitada a través de un motor conectado a la bureta multijeringa. Los cristales magnéticos se inmovilizan en la barra de agitación, el movimiento provocado por la agitación produce una dispersión de los cristales MIL-100 y por consecuencia se mejora el proceso de extracción aumentando su rendimiento. Los cristales MIL-100 se retienen nuevamente en la barra de agitación cuando la muestra se desea eliminar. En esta técnica se utilizaron pequeños cristales porosos como adsorbentes para SPE dispersiva automatizada, obteniendo buena repetibilidad de los resultados, además el adsorbente se puede reutilizar. La MSPE dispersiva "en jeringa" también se ha evaluado utilizando una estructura metal-orgánica (MOF) como precursor para obtener materiales de carbonos magnéticos porosos [195]. El método para la obtención del material adsorbente se describe a continuación: el ZIF-67 (Co (II) - 2-metilimidazol) se carbonizó en una atmósfera inerte obteniendo un carbono poroso que contenía nanopartículas de cobalto magnético. El carbono derivado de ZIF-67 se evaluó para la extracción de estrógenos, y se utilizó GC-MS para su separación y determinación. El mismo material desarrollado también se aplicó para la extracción automática de surfactantes aniónicos, método que se automatizó con la técnica SIA con detección espectrofotométrica [122]. En este trabajo, la eficiencia del proceso de MSPE se mejoró mediante la adición de un electroimán al sistema automatizado, generando campos magnéticos variables a través del procedimiento de MSPE.

El desarrollo de la robótica ha permitido la mecanización de los sistemas analíticos, un ejemplo es el desarrollo de un sistema MMR (Robot magnético mecanizado) construido en el laboratorio [196]. La función principal de este dispositivo es el movimiento del imán para lograr la inmovilización de las nanopartículas utilizadas para la extracción de cadmio. La automatización del sistema se llevó a cabo utilizando la técnica FIA, y para la cuantificación del analito se utilizó GFAAS. El cadmio se extrae utilizando partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Al}_2\text{O}_3$ funcionalizadas con 1-(2-piridilazo)-2-naftol y dodecilsulfato de sodio, la aplicación de este método se evaluó a través del análisis de muestras de aceites comerciales. La combinación de la robótica con los sistemas de análisis en flujo abre nuevas posibilidades y oportunidades para el desarrollo de nuevos métodos de pretratamiento automatizado de la muestra, incluida la extracción en fase sólida o líquida [197].

Las nanopartículas magnéticas basadas en Fe_3O_4 recubiertas con un polímero molecularmente impreso (MIP), fueron evaluadas como material adsorbente para la retención de hidroquinona, para su determinación se construyó un sistema combinando la técnica en flujo FIA con detección de quimioluminiscencia [198]. Se ha reportado la síntesis de microesferas magnéticas, las cuales combinan nanopartículas de Fe_3O_4 con un líquido iónico modificado. Estas microesferas se han implementado para la MSPE automatizada [199]. Las microesferas magnéticas en formato de microcolumna se han empleado para la extracción de colorantes alimenticios sintéticos, y para su automatización se utilizó un sistema FIA acoplado a HPLC y detección espectrofotométrica. La aplicación de materiales híbridos preparados en sistemas automatizados para la extracción en flujo mostró una buena reproducibilidad y un aumento en la eficiencia de la extracción.

9.4 Extracción con adsorbente agitado

La extracción con adsorbente agitado (SSE) se ha desarrollado como una nueva técnica, simple y eficiente para la extracción de analitos en muestras complejas [200]. La SSE se ha automatizado utilizando la técnica SIA para la determinación y separación de antiinflamatorios en muestras de orina utilizando HPLC-UV como sistema de separación y detección [105]. Para este método, se utilizó un disco de adsorbente comercial (C18) y fue inmovilizado en un imán para lograr una extracción automática con disco giratorio. El disco C18 funcionalizado en este método permitió la preconcentración de los analitos seleccionados, requiriendo un tiempo de extracción menor en comparación con otras metodologías similares no automatizadas. La técnica MSFIA también se ha empleado para desarrollar un método SSE, que incluye una barra de agitación recubierta con una mezcla de montmorillonita / resina epoxi para la extracción de clorofenoles [201]. La incorporación de montmorillonita en el material adsorbente proporcionó un área efectiva de extracción mayor sobre la superficie de la barra de agitación, mejorando el rendimiento de extracción del analito. El uso simultáneo de dos jeringas en la configuración automática aumentó el rendimiento de extracción al permitir un drenaje rápido de la cámara de extracción.

9.5 Extracción con membranas y discos

Se han utilizado ampliamente las membranas y discos de extracción comercial [202] en la SPE automatizada basada en flujo, ya sea de flujo continuo [203], o incorporándolas en optosensores [144]. Los discos comerciales para SPE están compuestos de un 90% de partículas y un 10% de teflón, obteniendo un disco uniforme. Recientemente se han evaluado y estudiado adsorbentes menos convencionales para SPE en formato de membrana / disco (Tabla 27). Un ejemplo, es el estudio de discos basados en un sol-gel recubierto para extraer cadmio y plomo en muestras de agua, los metales retenidos fueron determinados a través de una detección por AAS [204]. El material adsorbente estudiado se ha sintetizado a partir de un sustrato de poliéster y celulosa, que ha sido recubierto de sol gel, que a su vez es preparado a partir de copolímero de poli(dimetildifenilsiloxano) (PDMDPS) (Figura 39a). En esta investigación se evaluaron 4 recubrimientos diferentes con la finalidad de retener el complejo de ditiocarbamato de amonio-pirrolidina-Pb. El método SPE resultante se automatizó utilizando la técnica FIA (Figura 39b), alcanzando una alta reproducibilidad y sensibilidad.

Ghani et al. (2017) [205] realizó un estudio para la incorporación de un disco de matriz mixta para SPE automatizada. Los adsorbentes elaborados fueron fabricados a partir de MOF UiO-66-NH₂ (compuesto por Zr (IV) coordinado con ácido 2-aminotereftálico) y difluoruro de polivinilideno (PVDF) como aglutinante polimérico. La técnica SIA se utilizó para automatizar el método para SPE con discos de matriz mixta a partir de MOF (Figura 39c). Estos discos se fabricaron con MOF de diferentes tamaños de partículas y diferentes grupos funcionales. En dicho estudio se incluyeron MOFs de tamaño a nanoescala (Figura 39d). Los discos de matriz mixta a base de MOF mostraron un alto rendimiento de extracción de fenoles. Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados para los MOF con tamaño de partícula menor y con discos con grupos funcionales amino, grupos que se encuentran presentes en el enlace orgánico. Este trabajo abrió la posibilidad de estudiar otros tipos de materiales, que se pueden combinar con PDVF para la extracción de diferentes analitos, como MOFs combinados con derivados de carbonos, obteniendo aplicaciones con mayores ventajas y características analíticas para la eliminación de contaminantes del agua [206].

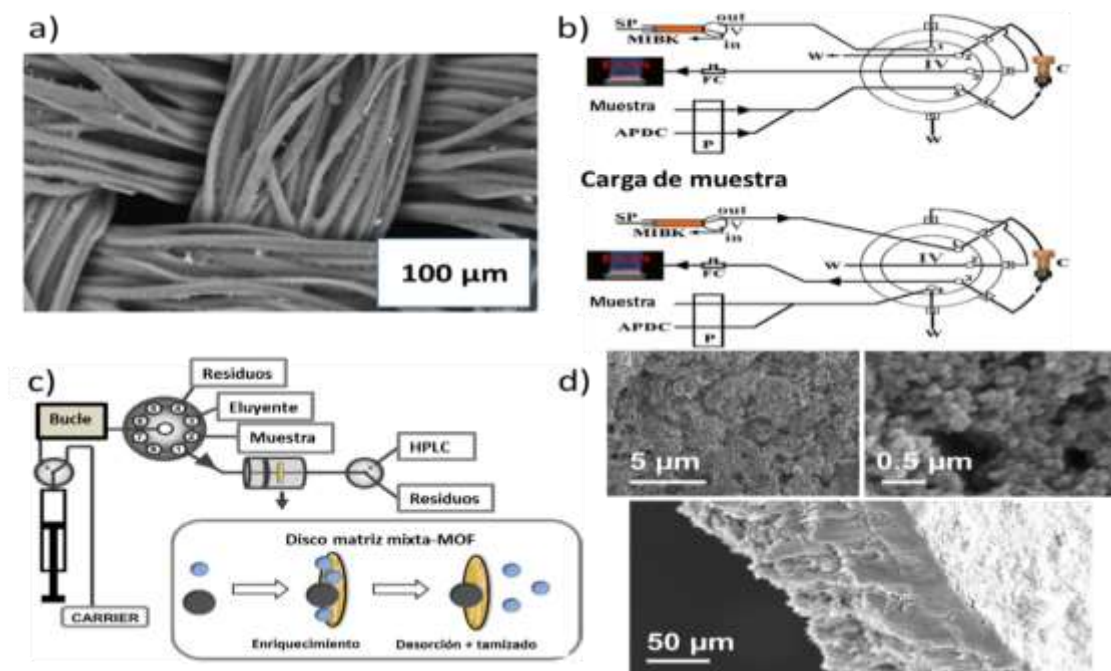


Figura 39. Sistemas en flujo basados en membranas no convencionales. a) Imagen SEM del absorbente fabricado con fibra recubierta y sol-gel PDMDPS. b) Sistema FIA-SPE basado en fibra recubierta de sol-gel; c) Sistema SIA con una membrana de matriz mixta basada en MOF. d) Imagen SEM de un disco de matriz mixta usando nanopartículas del MOF UiO-66-NH₂. Adaptación de las referencias [204] y [205] con permiso de Elsevier.

Un método similar al descrito en el párrafo anterior se ha desarrollado utilizando un disco de matriz mixta para la preconcentración de ácidos fenólicos [207]. En este caso, se evaluó como material adsorbente un disco de matriz mixta fabricado a partir de hidróxido de doble capa (LDH). El proceso de extracción se llevó a cabo en un manifold basado en SIA acoplado a un sistema HPLC-DAD. Este sistema de detección se utilizó para la separación de los analitos, lo que permite la determinación y separación de 3,4-dihidroxibenzoico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido gálico. El método fue aplicado a muestras de jugo de uva y cervezas de manera automática. Los discos de matriz mixta son una forma versátil y sencilla de preparar soportes de flujo para SPE con una alta reproducibilidad, abriendo nuevas posibilidades para el uso de micro / nanomateriales menos convencionales para aumentar el área efectiva para la retención de los analitos.

9.6 Extracción monolítica

Se ha comprobado que las estructuras monolíticas porosas se pueden aplicar como soportes eficientes para la preparación de muestras [208]. La alta transferencia de masa del analito en los monolitos se puede llevar a cabo a presiones relativamente bajas, como consecuencia los hace materiales adecuados para utilizarlos en combinación con técnicas de análisis en flujo a baja y media presión [209]. El desarrollo de monolitos sintetizados a partir de glicidil metacrilato-co-etilendimetacrilato y modificados con ácido iminodiacético permite la separación de macromoléculas (proteínas) utilizando técnicas en flujo basadas en jeringas [210]. En otra investigación también se aplicó un monolito polimérico poroso complejante similar para SPE en línea para la determinación de metales, pero en este trabajo la configuración del sistema consistía en la combinación de la técnica SIA con una detección electroquímica [211].

En otra investigación se presentó un sistema basado en espumas elásticas de carbono (CF) como material monolítico aplicado a un proceso de extracción, siendo este sistema ha aplicado a la retención de fenoles disruptores endocrinos automatizándolo con un sistema SIA (Figura 40a) [212]. El producto de la desorción de los analitos después de la etapa de elución se analiza off-line usando HPLC-DAD como sistema de detección. Los CF son materiales robustos, eficientes y de alta duración, que a su vez son obtenidos fácilmente a partir de la carbonización de espuma fabricada de melamina-formaldehído disponible comercialmente. Este proceso de carbonización se lleva a cabo a temperatura controlada bajo una atmósfera inerte. El material obtenido mostró un mayor rendimiento de extracción en comparación con sus precursores (polímero de melamina), o espumas de poliuretano (Figura 40b).

Los monolitos poliméricos también se han combinado con MOFs para la preparación automática de muestras, con la finalidad de extraer clorofenoles en muestras de agua [213]. Los MOFs se sintetizaron en la superficie de los poros del monolito, lo que se logró basándose en la incrustación preliminar de nanopartículas de un óxido de metal precursor en el monolito (Figura 40c). Las nanopartículas de óxido metálico se convierten mediante la reacción con MOFs básicos, lo que provoca el crecimiento de cristales pequeños y altamente porosos en la superficie de los poros del monolito precursor (Figura 40d). Recientemente se ha estudiado la conversión de nanopartículas de ZnO incrustadas en un monolito de polímero con el objetivo de hacer crecer los cristales de ZIF-8, utilizando 2-metilimidazol como ligando orgánico. El monolito resultante de la

combinación MOF / polímero mostró un mayor rendimiento para la extracción en flujo de clorofenoles en comparación con un monolito de polímero puro, obteniéndose un soporte de baja presión y con alto rendimiento para diversas aplicaciones en SPE automatizada.

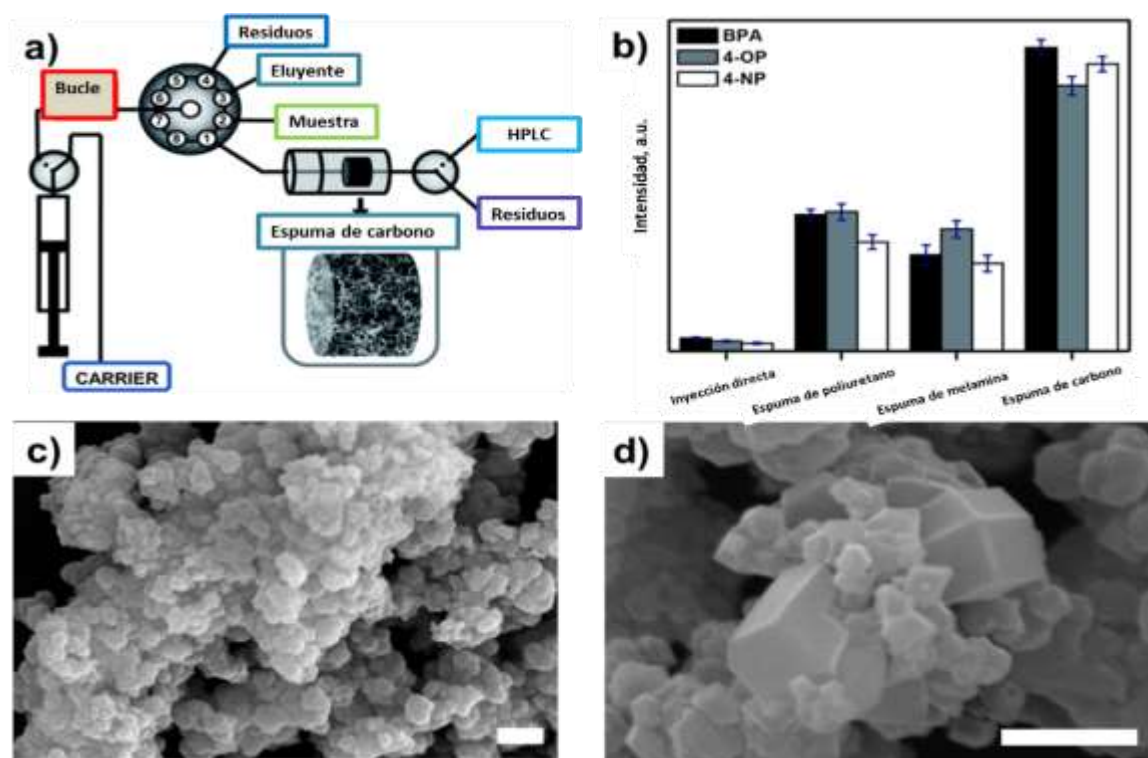


Figura 40. Monolitos sintetizados recientemente que se han aplicado en sistemas automatizados. a) Sistema SIA para SPE automatizada usando CF derivadas de polímero de melamina. b) Comparación del rendimiento de extracción usando CF sintetizadas. c) Imagen SEM de un monolito polimérico que contiene nanopartículas de ZnO integradas. d) Imagen SEM de un monolito de polímero a partir de nanopartículas de ZnO en cristales porosos de ZIF-8. (a,b) Adaptación de la referencia [212]. (c, d) Adaptación de la referencia [213] con permiso de la Sociedad Americana Química (ACS)

En un estudio reciente, se implementó un monolito MIP para la separación y determinación de 1-hidroxipireno en muestras biológicas (orina) utilizando la técnica FIA para la automatización del método [214]. Los componentes del monolito elaborado son: 1-hidroxipireno (plantilla), ácido metacrílico, etilenglicoldimetacrilato, 2,2-azo(bis)isobutironitrilo y acetonitrilo. El análisis del eluyente se llevó a cabo en un detector de fluorescencia después de la etapa de SPE. La aplicación del material desarrollado en SPE

automatizada se evaluó con resultados satisfactorios, abriendo la posibilidad de investigaciones futuras sobre materiales altamente selectivos en el pretratamiento de muestras.

Tabla 27. Métodos automáticos con materiales recientemente desarrollados (membranas, materiales magnéticos o monolitos) o utilizando adsorbentes agitados

Tipo de SPE	Material adsorbente	Técnica en flujo/Sistema de detección	Analito	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Aplicación (muestras)	Ref.
Adsorbentes magnéticos	Partículas magnéticas comerciales	SIA-Electrotérmica	Plaguicidas organofosforados	0.1	0.1-3.7	Agua de lago	[192]
	Nanopartículas magnéticas de Zr-Fe-C	FIA-SIA-HPLC-FLD	Medicamentos antimicrobianos de fluoroquinolona	1.5-3.0	5-1000	Alimentos para bebés	[193]
	Cristales MOF - nanopartículas Fe_3O_4	MSFIA-SIA-UV/Vis	Verde de malaquita	12	40-2000	Agua de río, pozo, grifo y pescado	[194]
	Carbonos magnéticos porosos derivados de ZIF	MSFIA-SIA-GC/MS	Estrógenos	2.2-3.8	7.5-1000	Agua residual	[195]
	Carbonos magnéticos porosos derivados de ZIF	SIA-UV/Vis	Surfactantes aniónicos	17.5	50-1000	Agua natural, subterránea y residual	[122]
	$\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Al}_2\text{O}_3$ funcionalizado con 1-(2-piridilazo)-2-naftol y dodecilsulfato de sodio	MMR-GFAAS	Cd	0.006	0.05-1	Aceites comestibles	[196]
	Nanopartículas Fe_3O_4 -ácido oleico recubierto con MIP	FIA-Quimioluminiscencia	Hidroquinona	0.079	0.2-100	Crema	[198]
Extracción con adsorbente agitado	Disco C18	SIA-HPLC-DAD	Antiinflamatorios	21.7-44.0	72.4-2000	Orina	[105]
	Montmorillonita con resina epoxi	MSFIA- HPLC-DAD	Clorofenoles	0.02-0.34	0.2-500	Agua de pozo, residual y lixiviados	[201]
Membranas	Sol-gel PDMDPS	FIA-FAAS	Pb Cd	1.8 0.4	6-300 1.2-60	Agua de río, mar y arroyo	[204]
	UiO-66- NH_2 -PVDF	SIA-HPLC-DAD	Clorofenoles	0.1	0.5-500	Agua subterránea	[205]

	LDH-Al ₂ O ₃ -PVDF	SIA-HPLC-DAD	Ácidos fenólicos	0.12-0.25	0.5-500	Jugo de uva y cervezas	[207]
Monolitos	Monolito de poli(glicidil metacrilato-co-etilendimetacrilato)	SIC-UV	Proteínas	0.003-0.006	0.03-7	Agua	[210]
	CFs – polímero de formaldehído melanina	SIA-HPLC-DAD	Fenoles	0.02-0.08	0.5-200	Agua de pozo, residual y lixiviado	[212]
	Monolito de ZIF/ZnO	SIA-HPLC-DAD	Clorofenoles	0.12-0.35	1-200	Agua subterránea, de lluvia y residual	[213]
	Polímero de impresión molecular	FIA-Fluorimetría	1-hidroxipireno	3.1	10-400	Orina	[214]

9.7 Conclusiones y perspectivas

El desarrollo de nuevas tecnologías y materiales implementados en métodos automáticos que utilizan técnicas de análisis en flujo, contribuyó a la miniaturización y mejora de las características analíticas de la SPE automatizada (Tabla 28).

Los avances recientes en la impresión 3D han permitido la fabricación de soportes con estructuras complejas y que se pueden integrar dentro del dispositivo diseñado para el pretratamiento de muestras a través de la SPE. Sin embargo, los adsorbentes clásicos (resinas particuladas, partículas magnéticas, discos) se incluyen dentro del dispositivo impreso 3D para permitir una extracción eficiente del analito debido a la superficie limitada y la funcionalidad de los dispositivos impresos 3D. Un tema de interés actual es el desarrollo de estrategias para modificar los polímeros impresos 3D y lograr una mayor versatilidad y rendimiento en el proceso de extracción. La impresión de polímeros que incluyen monómeros funcionales utilizando la técnica de impresión 3D abrirá nuevas líneas de estudio para la incorporación de grupos funcionales con fines específicos posterior a la impresión 3D. El desarrollo de técnicas de impresión 3D con alta resolución permitirá la obtención de dispositivos más miniaturizados en comparación con los existentes. El desarrollo de procedimientos para recubrimiento e inmovilización de adsorbentes comerciales o fabricados en laboratorio impulsará el desarrollo de dispositivos para SPE impresos 3D recubiertos con nanomateriales porosos, logrando mejorar el área efectiva de extracción. Además, también se necesita profundizar en el estudio de materiales imprimibles 3D con mayor estabilidad y resistencia, con el

propósito de que se pudiesen aplicar en SPE donde se involucren disolventes orgánicos como eluyentes. El uso de disolventes orgánicos puros puede afectar la estabilidad del dispositivo impreso 3D a largo plazo, creando posibles interferencias en la determinación analítica debido a los residuos de polímeros que se filtran provenientes del dispositivo, lo que es especialmente relevante cuando se utilizan técnicas de detección óptica.

Las investigaciones actuales sobre el desarrollo y aplicación de adsorbentes magnéticos han permitido la automatización de SPE basada en flujo, en las cuales se han utilizado materiales nanoestructurados sin la necesidad de empaquetarse y sin limitaciones de obstrucción. Dos puntos relevantes que se pueden seguir investigando son la forma de carga del adsorbente magnético a la red de flujo en la etapa de la automatización del método, así como la renovación automática del material adsorbente. Un tema de interés que se pudiese desarrollar e investigar es la manipulación automática de adsorbentes magnéticos nanoestructurados solubles, con el propósito de mejorar los factores de preconcentración.

Los reactores en flujo por lotes en combinación con técnicas en flujo, han permitido la automatización de técnicas de extracción basadas en disco giratorio o barra de agitación. En estudios actuales se han desarrollado recubrimientos comerciales, así como materiales sintetizados en laboratorio, obteniendo soportes de extracción con agitación; estos soportes tienen ventajas como una mayor simplicidad y eficiencia, utilizando discos adsorbentes comerciales o resinas epoxi. Sin embargo, se debe desarrollar el acoplamiento de los sistemas descritos con las técnicas de separación con la finalidad de obtener mejores beneficios al utilizar estos nuevos métodos de SPE automatizada.

Se han utilizado las membranas y discos en SPE automatizada, siendo estos materiales de especial interés debido a su alta eficiencia, además se puede llevar a cabo el proceso de extracción a presiones bajas. Recientemente se han investigado nuevos formatos para membrana o discos basados en fibras funcionales y matrices mixtas que contienen micro / nanomateriales. El progreso de los métodos con este tipo de formatos está determinado por la fabricación de nuevas membranas de matriz mixta que contengan materiales avanzados, como por ejemplo los carbones ultraporosos.

Otra de las tendencias actuales es la generación de monolitos a partir de polímeros y esponjas de carbono con elevada área efectiva. Estos materiales aplicados en la SPE proveen ciertas ventajas, tales como aumentar el rendimiento de estos soportes. Su

acoplamiento con técnicas cromatográficas sigue siendo necesario para la automatización completa de métodos destinados a la determinación simultánea de compuestos orgánicos.

Se requiere la implementación de sistemas de aseguramiento de la calidad / control de calidad para evaluar el potencial de estas nuevas metodologías desarrolladas en SPE automatizada con el propósito de utilizarlas para el análisis de rutina de muestras reales. Otro aspecto importante a considerar es la miniaturización de los dispositivos de extracción, con la finalidad de minimizar el uso de reactivos o disolventes, así como reducir la generación de desechos, siguiendo lo establecido por los principios de la química analítica verde (GAC) [215–217]. Algunos de estos principios son: disminuir la cantidad del adsorbente requerido, mejorar las eficiencias de extracción usando dispositivos de extracción de menor tamaño o desarrollar soportes de extracción altamente reutilizables. El uso de la impresión 3D para fabricar dispositivos y desarrollar métodos analíticos favorece los principios de la GAC, minimizando la cantidad de desechos producidos en la fabricación de los dispositivos de extracción.

Tabla 28. Ventajas y limitaciones de las metodologías recientes de SPE automatizada utilizando técnicas en flujo

SPE automatizada	Ventajas	Limitaciones
Impresión 3D	Fabricación reproducible de dispositivos con estructuras complejas	Limitaciones en el uso de disolventes orgánicos como eluyentes
Adsorbentes magnéticos	Empaquetamiento y renovación del material usando un campo magnético	Número limitado de adsorbentes comerciales. Se requiere sintetizarlos
Extracción con adsorbente agitado	Análisis de muestras con matriz compleja	Usualmente requiere de tiempos de extracción largos
Extracción con membranas/discos	Alta eficiencia de extracción y de transferencia de masa del analito. Preparación simple	Poca duración en comparación con polímeros monolíticos
Extracción monolítica	Alta eficiencia de extracción y de transferencia de masa del analito	Sobrepresión en el sistema con caudales altos

CAPÍTULO 10

Conclusiones

10.1 Conclusiones generales

Se han desarrollado e implementado diferentes metodologías analíticas para el análisis de muestras ambientales en la determinación de metales, mostrando mejores características analíticas y ventajas respecto a las metodologías existentes. Las metodologías desarrolladas están basadas en herramientas tecnológicas fabricadas en los últimos años, como la técnica de análisis en flujo multijeringa, la celda de flujo de largo paso óptico y/o la impresión 3D.

Se han logrado mejorar los límites de detección, la sensibilidad y los rangos lineales de trabajo en la determinación espectrofotométrica de bismuto, hierro o cromo (VI), debido al desarrollo de analizadores miniaturizados y automáticos, combinando MSFIA-LWCC para la determinación de bismuto, o MSFIA con dispositivos impresos 3D con estructuras complejas integradas para la determinación de cromo (VI), o hierro.

El diseño y fabricación de dispositivos de estructura compleja para la determinación de metales se ha logrado con la impresión 3D a través de la técnica SLA, conservando sus características intrínsecas de bajo coste, simplicidad y reproducibilidad. Además, el uso del formato digital (*.STL) permite el intercambio de los diseños para su reproducción y comparación entre laboratorios.

El uso de redes de cubos interconectados dentro de un dispositivo impreso 3D aumenta la interacción de la muestra con los reactivos, aumentando el flujo turbulento en el canal de flujo, y por lo tanto aumenta la señal analítica obtenida del analito de interés. Las ventajas obtenidas con las estructuras de cubos están conduciendo al reemplazo de las tuberías típicas usadas en métodos automáticos.

Dentro de un solo dispositivo impreso 3D se pueden llevar a cabo tres procesos químicos. Se ha estudiado una reacción de oxidación con fines de especiación, una retención a través del uso de un disco adsorbente y una reacción colorimétrica utilizada para la derivatización. Estas etapas han sido desarrolladas para la determinación de hierro con resultados satisfactorios.

En el estudio de la compatibilidad del uso de disolventes orgánicos como eluyentes en SPE en dispositivos impresos 3D se ha comprobado que el metanol en disolución ácida (80%) no afecta la estructura del dispositivo durante el desarrollo del método para la determinación de Cr (VI).

Se han evaluado diseños con estructuras complejas para la extracción con disco rotatorio, comprobando que la geometría de los dispositivos rotatorios influye en el

rendimiento de la extracción debido al comportamiento del movimiento turbulento del líquido durante el proceso de agitación. Además, se ha logrado obtener un método manual para una preconcentración multielemental utilizando un dispositivo impreso 3D de diseño circular con un disco adsorbente foto-inmovilizado.

Las muestras de matriz compleja que contienen metales pueden ser analizadas con la técnica de extracción con disco giratorio empleando un dispositivo impreso 3D, permitiendo la eliminación de la matriz y preconcentrando los metales en un disco adsorbente que está foto-inmovilizado sobre dicho dispositivo, obteniendo buenas características analíticas con detección ICP-OES.

Todos los métodos propuestos en esta tesis promueven los principios de la química analítica verde, específicamente en los principios de disminución del uso de reactivos, utilización de métodos automatizados, o miniaturizados, además de reducir la generación de residuos.

Finalmente, de acuerdo con el estado actual revisado en esta tesis sobre la extracción en fase sólida automatizada, la impresión 3D es una de las tendencias actuales que se están desarrollando para el pretratamiento de la muestra. Además, las aportaciones en impresión 3D marcan el progreso de la extracción en fase sólida automatizada, generando nuevos diseños para soportes de materiales adsorbentes, o en su caso la modificación de las resinas, o reactivos iniciales, aplicados a la determinación de analitos en condiciones específicas.

CAPÍTULO 11

Referencias

11.1 Referencias

- [1] T.E. Graedel, R. Barr, C. Chandler, T. Chase, J. Choi, L. Christoffersen, E. Friedlander, C. Henly, C. Jun, N.T. Nassar, D. Schechner, S. Warren, M. Yang, C. Zhu, Methodology of Metal Criticality Determination, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 1063–1070. doi:10.1021/es203534z.
- [2] J.J. Dulka, T.H. Risby, Ultratrace metals in some environmental and biological systems, *Anal. Chem.* 48 (1976) 640A–653A. doi: 10.1021/ac50002a001
- [3] J. Soares Jacundino, O. Silva Santos, J. Carinhanha Caldas Santos, W. Gustavo Botero, D. Goveia, J. Braga do Carmo, L. Camargo de Oliveira, Interactions between humin and potentially toxic metals: Prospects for its utilization as an environmental repair agent, *J. Environ. Chem. Eng.* 3 (2015) 708–715. doi:10.1016/j.jece.2015.03.032.
- [4] L.M. Marcó P., E. Jiménez, E.A. Hernández C., A. Rojas, E.D. Greaves, Determination of Zn/Cu ratio and oligoelements in serum samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry for cancer diagnosis, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 56 (2001) 2195–2201. doi:10.1016/S0584-8547(01)00289-0.
- [5] P.B. Tchounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patlolla, D.J. Sutton, Heavy Metals Toxicity and the Environment, *Mol. Clin. Environ. Toxicol.* (2012). doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- [6] C. Herrero Latorre, J. Álvarez Méndez, J. Barciela García, S. García Martín, R.M. Peña Crecente, Carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents prior to atomic spectrometric determination of metal species: A review, *Anal. Chim. Acta* 749 (2012) 16–35. doi:10.1016/j.aca.2012.09.001.
- [7] H. Bradl, *Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation*, Elsevier, (2005).
- [8] I. Thornton, Geochemical aspects of the distribution and forms of heavy metals in soils, in: *Eff. Heavy Met. Pollut. Plants*, Springer, (1981) 1–33.
- [9] Z.L. He, X.E. Yang, P.J. Stoffella, Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19 (2005) 125–140. doi:10.1016/j.jtemb.2005.02.010.
- [10] J.H. Kyle, P.L. Breuer, K.G. Bunney, R. Pleysier, Review of trace toxic elements (Pb, Cd, Hg, As, Sb, Bi, Se, Te) and their deportment in gold processing: Part II: Deportment in gold ore processing by cyanidation, *Hydrometallurgy* 111–112 (2012) 10–21. doi:10.1016/j.hydromet.2011.09.005.
- [11] F.M. El-Demerdash, M.I. Yousef, F.S. Kedwany, H.H. Baghdadi, Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene, *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 1563–1571. doi:10.1016/j.fct.2004.05.001.
- [12] A. Nematollahzadeh, S. Seraj, B. Mirzayi, Catecholamine coated maghemite nanoparticles for the environmental remediation: Hexavalent chromium ions

- removal, *Chem. Eng. J.* 277 (2015) 21–29. doi: 10.1016/j.cej.2015.04.135.
- [13] A. Violante, V. Cozzolino, L. Perelomov, A. Caporale, M. Pigna, Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments, *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10 (2010) 268–292. doi:10.4067/S0718-95162010000100005.
- [14] M. Magaritz, A.J. Amiel, D. Ronen, M.C. Wells, Distribution of metals in a polluted aquifer: A comparison of aquifer suspended material to fine sediments of the adjacent environment, *J. Contam. Hydrol.* 5 (1990) 333–347. doi:10.1016/0169-7722(90)90024-B.
- [15] A. Turner, G. Millward, Suspended Particles: Their Role in Estuarine Biogeochemical Cycles, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 55 (2002) 857–883. doi:10.1006/ecss.2002.1033.
- [16] M.S. Islam, M.K. Ahmed, M. Raknuzzaman, M. Habibullah -Al- Mamun, M.K. Islam, Heavy metal pollution in surface water and sediment: A preliminary assessment of an urban river in a developing country, *Ecol. Indic.* 48 (2015) 282–291. doi:10.1016/j.ecolind.2014.08.016.
- [17] T.D. Martin, J.T. Creed, S.E. Long, Methods for determination of metals in environmental Samples, C.K. SMOLEY, (1992) 15–24.
- [18] J. Csavina, J. Field, M.P. Taylor, S. Gao, A. Landázuri, E.A. Betterton, A.E. Sáez, A review on the importance of metals and metalloids in atmospheric dust and aerosol from mining operations, *Sci. Total Environ.* 433 (2012) 58–73. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.013.
- [19] E.G. Pacyna, J.M. Pacyna, J. Fudala, E. Strzelecka-Jastrzab, S. Hlawiczka, D. Panasiuk, S. Nitter, T. Pregger, H. Pfeiffer, R. Friedrich, Current and future emissions of selected heavy metals to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe, *Atmos. Environ.* 41 (2007) 8557–8566. doi:10.1016/j.atmosenv.2007.07.040.
- [20] A.K. Das, R. Chakraborty, M.L. Cervera, M. de la Guardia, Analytical techniques for the determination of bismuth in solid environmental samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 599–608. doi:10.1016/j.trac.2006.01.006.
- [21] C.P. Ferrari, S. Hong, K. Van de Velde, C.F. Boutron, S.N. Rudniev, M. Bolshov, W. Chisholm, K.J.R. Rosman, Natural and anthropogenic bismuth in Central Greenland, *Atmos. Environ.* 34 (2000) 941–948. doi:10.1016/S1352-2310(99)00257-5.
- [22] N. Yang, H. Sun, Bismuth: environmental pollution and health effects, *Encycl. Environ. Heal.* (2011).
- [23] S. Cadore, A. P. dos Anjos, N. Baccan, Determination of bismuth in urine and prescription medicines using atomic absorption with an on-line hydride generation system, *Analyst* 123 (1998) 1717–1719. doi:10.1039/A804177F.
- [24] J. Liu, W. Qu, M.B. Kadiiska, Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (2009) 209–214. doi:10.1016/j.taap.2009.01.029.

- [25] A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel, *Cadmium: from toxicity to essentiality*, Springer, (2013).
- [26] M.S. Khan, A. Zaidi, R. Goel, J. Musarrat, *Bio-management of metal-contaminated soils*, Springer Science & Business Media, (2011).
- [27] H.-R. Chang, D.-A. Tsao, W.-C. Tseng, Hexavalent chromium inhibited the expression of RKIP of heart in vivo and in vitro, *Toxicol. Vitr.* 25 (2011) 1–6. doi:10.1016/j.tiv.2010.06.012.
- [28] E.N. Whitney, C.B. Cataldo, S.R. Rolfes, *Understanding Normal and Clinical Nutrition*, Belmont, (1998).
- [29] K. Rhoads, C.L. Sanders, Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung, *Environ. Res.* 36 (1985) 359–378. doi:10.1016/0013-9351(85)90031-3.
- [30] R.A. Goyer, T.W. Clarkson, *Toxic effects of metals*, Casarett Doull's *Toxicol. Basic Sci. Poisons*, Fifth Ed. Klaassen, CD [Ed]. McGraw-Hill Heal. Prof. Div. ISBN. 71054766 (1996).
- [31] G. Scansetti, G. Maina, G.C. Botta, P. Bambace, P. Spinelli, Exposure to cobalt and nickel in the hard-metal production industry, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 71 (1998) 60–63. doi:10.1007/s004200050251.
- [32] M. Faraji, Y. Yamini, S. Shariati, Application of cotton as a solid phase extraction sorbent for on-line preconcentration of copper in water samples prior to inductively coupled plasma optical emission spectrometry determination, *J. Hazard. Mater.* 166 (2009) 1383–1388. doi:10.1016/j.jhmat.2008.12.063.
- [33] L.M. Gaetke, C.K. Chow, Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients, *Toxicology* 189 (2003) 147–163. doi:10.1016/S0300-483X(03)00159-8.
- [34] C.A. Flemming, J.T. Trevors, Copper toxicity and chemistry in the environment: a review, *Water. Air. Soil Pollut.* 44 (1989) 143–158. doi:10.1007/BF00228784.
- [35] R.K. Kamble, M.G. Thakare, A.B. Ingle, Iron in the Environment, *Indian J. Environmental Prot.* 33 (2013) 881–888.
- [36] M. Puliyeel, A.G. Mainous, V. Berdoukas, T.D. Coates, Iron toxicity and its possible association with treatment of Cancer: Lessons from hemoglobinopathies and rare, transfusion-dependent anemias, *Free Radic. Biol. Med.* 79 (2015) 343–351. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.861.
- [37] C. Colombo, G. Palumbo, J.-Z. He, R. Pinton, S. Cesco, Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes, *J. Soils Sediments* 14 (2014) 538–548. doi:10.1007/s11368-013-0814-z.
- [38] D.G. Marbaniang, Spectrophotometric determination of Manganese in ground water in Shillong City using bismuthate oxidation method, *Int. J. Environ. Prot.*, 2 (2012) 22-26.
- [39] P.K. Pal, A. Samii, D.B. Calne, Manganese neurotoxicity: a review of clinical

- features, imaging and pathology, *Neurotoxicology* 20 (1999) 227–238. ISSN: 0161-813X
- [40] A.S. Hazell, Astrocytes and manganese neurotoxicity, *Neurochem. Int.* 41 (2002) 271–277. doi:10.1016/S0197-0186(02)00013-X.
- [41] G.F. Pearson, G.M. Greenway, Recent developments in manganese speciation, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 803–809. doi:10.1016/j.trac.2005.02.008.
- [42] P.C. Rettig, ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry): medical waste poses no threat to public, *Health Facil. Manage.* 3 (1990) 60–62. ISSN: 0899-6210
- [43] J. Yin, Y. Hu, J. Yoon, Fluorescent probes and bioimaging: alkali metals, alkaline earth metals and pH, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 4619–4644. doi:10.1039/C4CS00275J.
- [44] R.C. Ropp, *Encyclopedia of the alkaline earth compounds*, Newnes, (2012).
- [45] O.H. Pattee, D.J. Pain, Lead in the environment, *Handb. Ecotoxicol.* 2 (2003) 373–399.
- [46] H. Cheng, Y. Hu, Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: A review, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 1134–1146. doi:10.1016/j.envpol.2009.12.028.
- [47] N.D. Vaziri, Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 295 (2008) H454–H465. doi:10.1152/ajpheart.00158.2008.
- [48] R.K. Sharma, M. Agrawal, Biological effects of heavy metals: an overview, *J. Environ. Biol.* 26 (2005) 301–313. ISSN : 0254-8704
- [49] M. Cempel, G. Nickel, Nickel: A review of its sources and environmental toxicology., *Polish J. Environ. Stud.* 15 (2006). ISSN: 1230-1485
- [50] R.N.M.J. Páscoa, I. V. Tóth, A.A. Almeida, A.O.S.S. Rangel, Spectrophotometric sensor system based on a liquid waveguide capillary cell for the determination of titanium: Application to natural waters, sunscreens and a lake sediment, *Sensors Actuators B Chem.* 157 (2011) 51–56. doi:10.1016/j.snb.2011.03.025.
- [51] Y. Li, C. Wong, J. Xiong, P. Hodgson, C. Wen, Cytotoxicity of Titanium and Titanium Alloying Elements, *J. Dent. Res.* 89 (2010) 493–497. doi:10.1177/0022034510363675.
- [52] T. Asadollahi, S. Dadfarnia, A.M.H. Shabani, Separation/preconcentration and determination of vanadium with dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop (DLLME-SFO) and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 82 (2010) 208–212. doi:10.1016/j.talanta.2010.04.020.
- [53] J.L. Domingo, Vanadium: A review of the reproductive and developmental toxicity, *Reprod. Toxicol.* 10 (1996) 175–182. doi:10.1016/0890-6238(96)00019-6.

- [54] F. Edition, W.H.O. (Who), Guidelines for Drinking-water Quality, World Health. (2011). doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6.
- [55] Secretaría de salud SSA, NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, Diario Oficial de la Federación, México, (1994).
- [56] Ministerio de la Presidencia, Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, Boletín Oficial del Estado, España, (2003).
- [57] EPA, Drinking Water Parameters, United States Environmental Protection Agency, Estados Unidos de América, (2014).
- [58] EPA, Secondary drinking water standards: Guidance for nuisance chemicals, United States Environmental Protection Agency, Estados Unidos de América (2017).
- [59] Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT, NOM-001-SEMARNAT-1996 Límites Máximos Permisibles De Contaminantes En Las Descargas De Aguas Residuales En Aguas Y Bienes Nacionales, Diario Oficial de la Federación, México, (1998).
- [60] C. Griffiths, H. Klemick, M. Massey, C. Moore, S. Newbold, D. Simpson, P. Walsh, W. Wheeler, U.S. Environmental Protection Agency Valuation of Surface Water Quality Improvements, *Rev. Environ. Econ. Policy.* (2012). doi: 10.1093/reep/rer025.
- [61] Ministerio de la Presidencia, Real Decreto 60/2011, de 21 de Enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, Boletín Oficial del Estado, España, (2011). <https://www.boe.es/buscar/pdf/2011/BOE-A-2011-1139-consolidado.pdf>.
- [62] Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT, NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio, Diario Oficial de la Federación, México (2007).
- [63] EPA, Regional Screening Levels (RSLs) - Generic Tables, Estados Unidos de América (2018). <https://www.epa.gov/risk/regional-screening-levels-rsls-generic-tables>.
- [64] Parlamento de las Islas Baleares, Ley RGE núm. 7154/18, de residuos y suelos contaminados de las Illes Balears, Boletín Oficial de las Islas Baleares, España, (2018).
- [65] M. Ghaedi, F. Ahmadi, A. Shokrollahi, Simultaneous preconcentration and determination of copper, nickel, cobalt and lead ions content by flame atomic absorption spectrometry, *J. Hazard. Mater.* 142 (2007) 272–278. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.08.012.

- [66] F. Xie, X. Lin, X. Wu, Z. Xie, Solid phase extraction of lead (II), copper (II), cadmium (II) and nickel (II) using gallic acid-modified silica gel prior to determination by flame atomic absorption spectrometry, *Talanta* 74 (2008) 836–843. doi:10.1016/j.talanta.2007.07.018.
- [67] M. das G. Andrade Korn, E.S. da Boa Morte, D.C.M. Batista dos Santos, J.T. Castro, J.T.P. Barbosa, A.P. Teixeira, A.P. Fernandes, B. Welz, W.P.C. dos Santos, E.B.G. Nunes dos Santos, M. Korn, Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review, *Appl. Spectrosc. Rev.* 43 (2008) 67–92. doi:10.1080/05704920701723980.
- [68] R.Q. Aucélio, R.M. de Souza, R.C. de Campos, N. Miekeley, C.L.P. da Silveira, The determination of trace metals in lubricating oils by atomic spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 62 (2007) 952–961. doi:10.1016/j.sab.2007.05.003.
- [69] M. Tüzen, Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 74 (2003) 289–297. doi:10.1016/S0026-265X(03)00035-3.
- [70] P. Pohl, Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 117–128. doi:10.1016/j.trac.2008.09.015.
- [71] M.T. Naseri, M.R. Milani Hosseini, Y. Assadi, A. Kiani, Rapid determination of lead in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 75 (2008) 56–62. doi:10.1016/j.talanta.2007.10.029.
- [72] Y. Chen, M. Li, L. Fu, X. Hou, X. Jiang, Simultaneous determination of trace cadmium and lead in single human hair by tungsten electrothermal vaporization-flame atomic fluorescence spectrometry, *Microchem. J.* 114 (2014) 182–186. doi:10.1016/j.microc.2014.01.002.
- [73] M. He, L. Huang, B. Zhao, B. Chen, B. Hu, Advanced functional materials in solid phase extraction for ICP-MS determination of trace elements and their species - A review, *Anal. Chim. Acta* 973 (2017) 1–24. doi:10.1016/j.aca.2017.03.047.
- [74] H.-H. Perkampus, *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*, Springer Science & Business Media, (2013).
- [75] D.F. Swinehart, The beer-lambert law, *J. Chem. Educ.* 39 (1962) 333.
- [76] N. Sharma, A.K.K.V. Pillai, N. Pathak, A. Jain, K.K. Verma, Liquid-phase microextraction and fibre-optics-based cuvetteless CCD-array micro-spectrophotometry for trace analysis, *Anal. Chim. Acta* 648 (2009) 183–193. doi:10.1016/j.aca.2009.07.006.
- [77] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 64 (2009) 1–15. doi:10.1016/j.sab.2008.10.042.

- [78] L.J. Gimbert, P.J. Worsfold, Environmental applications of liquid-waveguide-capillary cells coupled with spectroscopic detection, *TrAC Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 914–930. doi:10.1016/j.trac.2007.08.005.
- [79] R.N.M.J. Pascoa, I. V Toth, A.O.S.S. Rangel, Review on recent applications of the liquid waveguide capillary cell in flow based analysis techniques to enhance the sensitivity of spectroscopic detection methods., *Anal. Chim. Acta* 739 (2012) 1–13. doi:10.1016/j.aca.2012.05.058.
- [80] T. Dallas, P.K. Dasgupta, Light at the end of the tunnel: recent analytical applications of liquid-core waveguides, *TrAC Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 385–392. doi:10.1016/S0165-9936(04)00522-9.
- [81] J.W. Olesik, Elemental analysis using ICP-OES and ICP/MS, *Anal. Chem.* 63 (1991) 12A–21A. doi: 10.1021/ac00001a001
- [82] C.G. Novaes, M.A. Bezerra, E.G.P. da Silva, A.M.P. dos Santos, I.L. da S. Romão, J.H. Santos Neto, A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES), *Microchem. J.* 128 (2016) 331–346. doi:10.1016/j.microc.2016.05.015.
- [83] R.K. Soodan, Y.B. Pakade, A. Nagpal, J.K. Katnoria, Analytical techniques for estimation of heavy metals in soil ecosystem: A tabulated review, *Talanta.* 125 (2014) 405–410. doi:10.1016/j.talanta.2014.02.033.
- [84] V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerdà, *Flow analysis: a practical guide*, Newnes, (2014).
- [85] A. Cerdà, V. Cerdà, *An introduction to flow analysis*, Sciware, Palma de Mallorca. (2009).
- [86] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Completely Automated System for Determining Halogenated Organic Compounds by Multisyringe Flow Injection Analysis, *Anal. Chem.* 80 (2008) 5799–5805. doi:10.1021/ac8004633.
- [87] F. Maya, B. Horstkotte, J.M. Estela, V. Cerdà, Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection., *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 909–917. doi:10.1007/s00216-012-6159-4.
- [88] M. Trojanowicz, *Advances in flow analysis*, John Wiley & Sons, (2008).
- [89] M.A. Segundo, L.M. Magalhaes, Multisyringe flow injection analysis: State-of-the-art and perspectives., *Anal. Sci.* 22 (2006) 3–8. doi:10.2116/analsci.22.3.
- [90] C.E. Lenehan, N.W. Barnett, S.W. Lewis, Sequential injection analysis, *Analyst* 127 (2002) 997–1020. doi:10.1039/B106791P.
- [91] V. Cerdà, J. Avivar, A. Cerdà, Laboratory automation based on flow techniques., *Pure Appl. Chem.* 84 (2012) 1983–1998. doi:10.1351/pac-con-11-11-14.
- [92] V. Cerdà, L. Ferrer, L.A. Portugal, C.T. de Souza, S.L.C. Ferreira, Multisyringe flow injection analysis in spectroanalytical techniques – A review, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 98 (2018) 1–18. doi:10.1016/j.trac.2017.10.016.

- [93] M. Miro, V. Cerdà, J.M. Estela, Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 199–210. doi:10.1016/S0165-9936(02)00307-2.
- [94] P.C.A.G. Pinto, M. Lucia, M.F.S. Saraiva, J.L.F.C. Lima, Sequential Injection Analysis Hyphenated with Other Flow Techniques: A Review., *Anal. Lett.* 44 (2011) 374–397. doi:10.1080/00032719.2010.500780.
- [95] T. Hyötyläinen, Critical evaluation of sample pretreatment techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 743–758. doi:10.1007/s00216-009-2772-2.
- [96] M. Ferrá, S. Pérez, C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, D. Barceló, Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1347–1362. doi:10.1016/j.trac.2010.07.016.
- [97] M. Tuzen, M. Soylak, L. Elci, Multi-element pre-concentration of heavy metal ions by solid phase extraction on Chromosorb 108, *Anal. Chim. Acta* 548 (2005) 101–108. doi:10.1016/j.aca.2005.06.005.
- [98] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid phase extraction of organic compounds: a critical review. part i, *TrAC Trends Anal. Chem. Anal. Chem.* 80 (2015) 1–42. doi:10.1016/j.trac.2015.08.015.
- [99] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 655–667. doi:10.1016/j.trac.2015.08.014.
- [100] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, *TrAC Trends Anal. Chem.* 77 (2016) 23–43. doi:10.1016/j.trac.2015.10.010.
- [101] V.A. Lemos, L.S.G. Teixeira, M. de A. Bezerra, A.C.S. Costa, J.T. Castro, L.A.M. Cardoso, D.S. de Jesus, E.S. Santos, P.X. Baliza, L.N. Santos, New Materials for Solid-Phase Extraction of Trace Elements, *Appl. Spectrosc. Rev.* 43 (2008) 303–334. doi:10.1080/05704920802031341.
- [102] E.M. Thurman, K. Snavelly, Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 18–26. doi:10.1016/S0165-9936(99)00175-2.
- [103] A.A. Hill, R.J. Lipert, M.D. Porter, Determination of colloidal and dissolved silver in water samples using colorimetric solid-phase extraction, *Talanta* 80 (2010) 1606–1610. doi:10.1016/j.talanta.2009.09.056.
- [104] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Miniaturized solid-phase extraction techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 19–38. doi:10.1016/j.trac.2015.04.026.
- [105] V. Manzo, M. Miró, P. Richter, Programmable flow-based dynamic sorptive microextraction exploiting an octadecyl chemically modified rotating disk extraction system for the determination of acidic drugs in urine, *J. Chromatogr. A* 1368 (2014) 64–69. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.079.

- [106] F.F. Donato, N.M.G. Bandeira, G.C. dos Santos, O.D. Prestes, M.B. Adaime, R. Zanella, Evaluation of the rotating disk sorptive extraction technique with polymeric sorbent for multiresidue determination of pesticides in water by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1516 (2017) 54–63. doi:10.1016/j.chroma.2017.08.025.
- [107] M. Becerra-Herrera, V. Miranda, D. Arismendi, P. Richter, Chemometric optimization of the extraction and derivatization of parabens for their determination in water samples by rotating-disk sorptive extraction and gas chromatography mass spectrometry, *Talanta* 176 (2018) 551–557. doi:10.1016/j.talanta.2017.08.071.
- [108] K.B. Anderson, S.Y. Lockwood, R.S. Martin, D.M. Spence, A 3D printed fluidic device that enables integrated features, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5622–5626. doi:10.1021/ac4009594.
- [109] A. Ambrosi, M. Pumera, 3D-printing technologies for electrochemical applications, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 2740–2755. doi: 10.1039/C5CS00714C
- [110] P.J. Bártolo, *Stereolithography*, 1st ed., Springer US, 2011. doi:10.1007/978-0-387-92904-0.
- [111] M.D. Symes, P.J. Kitson, J. Yan, C.J. Richmond, G.J.T. Cooper, R.W. Bowman, T. Vilbrandt, L. Cronin, Integrated 3D-printed reactionware for chemical synthesis and analysis, *Nat. Chem.* 4 (2012) 349–354. doi: 10.1038/nchem.1313
- [112] B.C. Gross, J.L. Erkal, S.Y. Lockwood, C. Chen, D.M. Spence, Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3240–3253. doi: 10.1021/ac403397r
- [113] N.P. Macdonald, J.M. Cabot, P. Smejkal, R.M. Guijt, B. Paull, M.C. Breadmore, Comparing Microfluidic Performance of Three-Dimensional (3D) Printing Platforms, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3858–3866. doi:10.1021/acs.analchem.7b00136.
- [114] S. Waheed, J.M. Cabot, N.P. Macdonald, T. Lewis, R.M. Guijt, B. Paull, M.C. Breadmore, 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers, *Lab Chip* 16 (2016) 1993–2013. doi: 10.1039/C6LC00284F
- [115] B.C. Gross, S.Y. Lockwood, D.M. Spence, Recent Advances in Analytical Chemistry by 3D Printing, *Anal. Chem.* (2016) 57-70. doi: 10.1021/acs.analchem.6b04344
- [116] S. Tsuda, H. Jaffery, D. Doran, M. Hezwani, P.J. Robbins, M. Yoshida, L. Cronin, Customizable 3D printed ‘plug and play’ microfluidic devices for programmable fluidics, *PLoS One* 10 (2015) 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0141640
- [117] R. Amin, S. Knowlton, A. Hart, B. Yenilmez, F. Ghaderinezhad, S. Katebifar, M. Messina, A. Khademhosseini, S. Tasoglu, 3D-printed microfluidic devices, *Biofabrication* 8 (2016) 22001. doi:10.1088/1758-5090/8/2/022001
- [118] A.I. Shallan, P. Smejkal, M. Corban, R.M. Guijt, M.C. Breadmore, Cost-Effective Three-Dimensional Printing of Visibly Transparent Microchips within Minutes, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3124–3130. doi:10.1021/ac4041857.

- [119] R.M. Frizzarin, E. Aguado, L.A. Portugal, D. Moreno, J.M. Estela, F.R.P. Rocha, V. Cerdà, A portable multi-syringe flow system for spectrofluorimetric determination of iodide in seawater, *Talanta* 144 (2015) 1155–1162. doi:10.1016/j.talanta.2015.07.069.
- [120] C.-K. Su, S.-C. Yen, T.-W. Li, Y.-C. Sun, Enzyme-Immobilized 3D-Printed Reactors for Online Monitoring of Rat Brain Extracellular Glucose and Lactate, *Anal. Chem.* 88 (2016) 6265–6273. doi:10.1021/acs.analchem.6b00272.
- [121] É.M. Kataoka, R.C. Murer, J.M. Santos, R.M. Carvalho, M.N. Eberlin, F. Augusto, R.J. Poppi, A.L. Gobbi, L.W. Hantao, Simple, Expendable, 3D-Printed Microfluidic Systems for Sample Preparation of Petroleum, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3460–3467. doi:10.1021/acs.analchem.6b04413.
- [122] R.M. Frizzarin, C. Palomino Cabello, M. del M. Bauzá, L.A. Portugal, F. Maya, V. Cerdà, J.M. Estela, G. Turnes Palomino, Submicrometric Magnetic Nanoporous Carbons Derived from Metal–Organic Frameworks Enabling Automated Electromagnet-Assisted Online Solid-Phase Extraction, *Anal. Chem.* 88 (2016) 6990–6995. doi:10.1021/acs.analchem.6b02065.
- [123] C.K. Su, P.J. Peng, Y.C. Sun, Fully 3D-Printed Preconcentrator for Selective Extraction of Trace Elements in Seawater, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6945–6950. doi:10.1021/acs.analchem.5b01599.
- [124] S.K. Anciaux, M. Geiger, M.T. Bowser, 3D Printed Micro Free-Flow Electrophoresis Device, *Anal. Chem.* 88 (2016) 7675–7682. doi:10.1021/acs.analchem.6b01573.
- [125] K.B. Spilstead, J.J. Learey, E.H. Doeven, G.J. Barbante, S. Mohr, N.W. Barnett, J.M. Terry, R.M. Hall, P.S. Francis, 3D-printed and CNC milled flow-cells for chemiluminescence detection, *Talanta* 126 (2014) 110–115. doi: 10.1016/j.talanta.2014.03.047
- [126] C.-K. Su, S.-C. Hsia, Y.-C. Sun, Three-dimensional printed sample load/inject valves enabling online monitoring of extracellular calcium and zinc ions in living rat brains, *Anal. Chim. Acta* 838 (2014) 58–63. doi: 10.1016/j.aca.2014.06.037
- [127] V. Camel, Solid phase extraction of trace elements, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 58 (2003) 1177–1233. doi: 10.1016/S0584-8547
- [128] A. Spietelun, Ł. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry, *J. Chromatogr. A* 1321 (2013) 1–13. doi: 10.1016/j.chroma.2013.10.030
- [129] É.A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 224–235. doi: 10.1016/j.trac.2015.04.016
- [130] A. Waldbaur, H. Rapp, K. Lange, B.E. Rapp, Let there be chip-towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes, *Anal. Methods* 3 (2011) 2681–2716. doi:10.1039/C1AY05253E.

- [131] A.K. Au, W. Lee, A. Folch, Mail-order microfluidics: evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices, *Lab Chip* 14 (2014) 1294–1301. doi:10.1039/C3LC51360B
- [132] J.W. Stansbury, M.J. Idacavage, 3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities, *Dent. Mater.* 32 (2016) 54–64. doi:10.1016/j.dental.2015.09.018.
- [133] S.C. Ligon, R. Liska, J. Stampfl, M. Gurr, R. Mülhaupt, Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing, *Chem. Rev.* 117 (2017) 10212–10290. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00074.
- [134] A.K. Au, N. Bhattacharjee, L.F. Horowitz, T.C. Chang, A. Folch, 3D-printed microfluidic automation, *Lab Chip* 15 (2015) 1934–1941. doi:10.1039/C5LC00126A
- [135] T.D. Ngo, A. Kashani, G. Imbalzano, K.T.Q. Nguyen, D. Hui, Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges, *Compos. Part B Eng.* 143 (2018) 172–196. doi:10.1016/j.compositesb.2018.02.012.
- [136] P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, A. Economou, Sequential injection method for the direct spectrophotometric determination of bismuth in pharmaceutical products, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 167–171. doi:10.1016/S0003-2670(03)00017-5.
- [137] P.C.A. Jerónimo, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, D. Satinský, P. Solich, Colorimetric bismuth determination in pharmaceuticals using a xylenol orange sol-gel sensor coupled to a multicommutated flow system, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 235–241. doi:10.1016/j.aca.2003.10.049.
- [138] A. González-Portal, F. Bermejo-Martínez, C. Baluja-Santos, M.C. Díez-Rodríguez, Spectrophotometric study of bismuth with N-(2-acetamido)iminodiacetic acid (ADA): Determination of bismuth in pharmaceutical formulations, *Microchem. J.* 31 (1985) 368–374. doi:10.1016/0026-265X(85)90128-6.
- [139] J. Szpunar-Łobińska, Extraction flow-injection spectrophotometric determination of bismuth with lead tetramethylenedithiocarbamate, *Anal. Chim. Acta* 251 (1991) 275–280. doi:10.1016/0003-2670(91)87147-Y.
- [140] M.J. Hernandez, C.B. Moreno, M.R. Carabias, D.L. Gutierrez, Spectrophotometric determination of tin (IV) with catechol violet sensitized polyvinylpyrrolidone, *Microchem. J.* 35 (1987) 288. doi:10.1016/0026-265X(87)90112-3
- [141] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, Expert multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron using chelating disks in water samples, *Anal. Chim. Acta* (2004)79–88. doi:10.1016/j.aca.2004.01.011.
- [142] E. Marguá, M. Hidalgo, I. Queralt, K. Van Meel, C. Fontàs, Analytical capabilities of laboratory, benchtop and handheld X-ray fluorescence systems for detection of metals in aqueous samples pre-concentrated with solid-phase extraction disks, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 67 (2012) 17–23. doi:10.1016/j.sab.2011.12.004.

- [143] E.P. Achterberg, T.W. Holland, A.R. Bowie, R.F.C. Mantoura, P.J. Worsfold, Determination of iron in seawater, *Anal. Chim. Acta* 442 (2001) 1–14. doi:10.1016/S0003-2670(01)01091-1.
- [144] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples, *Talanta* 66 (2005) 210–217. doi: 10.1016/j.aca.2005.06.072
- [145] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, Multi-pumping flow system for the determination, solid-phase extraction and speciation analysis of iron, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 33–39. doi: 10.1016/j.aca.2005.06.072
- [146] A. Tunçeli, A.R. Türker, Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in water after preconcentration of its 1,5-diphenylcarbazone complex on amberlite XAD-16 resin and determination by FAAS, *Talanta* 57 (2002) 1199–1204. doi:10.1016/S0039-9140(02)00237-0.
- [147] V.N. Bulut, C. Duran, M. Tufekci, L. Elci, M. Soylak, Speciation of Cr(III) and Cr(VI) after column solid phase extraction on Amberlite XAD-2010, *J. Hazard. Mater.* 143 (2007) 112–117. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.08.074.
- [148] S.-I. Ohira, K. Nakamura, C.P. Shelor, P.K. Dasgupta, K. Toda, Simultaneous Electrodealytic Preconcentration and Speciation of Chromium(III) and Chromium(VI), *Anal. Chem.* 87 (2015) 11575–11580. doi:10.1021/acs.analchem.5b03464.
- [149] H. Sereshti, M. Vasheghani Farahani, M. Baghdadi, Trace determination of chromium(VI) in environmental water samples using innovative thermally reduced graphene (TRG) modified SiO₂ adsorbent for solid phase extraction and UV–vis spectrophotometry, *Talanta* 146 (2016) 662–669. doi:10.1016/j.talanta.2015.06.051.
- [150] E. Rossi, M.I. Errea, M.M.F. de Cortalezzi, J. Stripeikis, Selective determination of Cr (VI) by on-line solid phase extraction FI-SPE-FAAS using an ion exchanger resin as sorbent: An improvement treatment of the analytical signal, *Microchem. J.* 130 (2017) 88–92. doi:10.1016/j.microc.2016.08.004.
- [151] G. Peng, Q. He, Y. Lu, J. Huang, J.-M. Lin, Flow injection microfluidic device with on-line fluorescent derivatization for the determination of Cr(III) and Cr(VI) in water samples after solid phase extraction, *Anal. Chim. Acta* 955 (2017) 58–66. doi:10.1016/j.aca.2016.11.057.
- [152] T. Inui, K. Fujita, M. Kitano, T. Nakamura, Determination of Cr(III) and Cr(VI) at Sub-ppb Levels in Water with Solid-Phase Extraction/Metal Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *Anal. Sci.* 26 (2010) 1093–1098. doi:10.2116/analsci.26.1093.
- [153] M. Tuzen, M. Soylak, Multiwalled carbon nanotubes for speciation of chromium in environmental samples, *J. Hazard. Mater.* 147 (2007) 219–225. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.12.069.
- [154] M. Bhaumik, A. Maity, V.V. Srinivasu, M.S. Onyango, Enhanced removal of

- Cr(VI) from aqueous solution using polypyrrole/Fe₃O₄ magnetic nanocomposite, *J. Hazard. Mater.* 190 (2011) 381–390. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.03.062.
- [155] H. Maltez, E. Carasek, Chromium speciation and preconcentration using zirconium(IV) and zirconium(IV) phosphate chemically immobilized onto silica gel surface using a flow system and F AAS, *Talanta* 65 (2005) 537–542. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.017.
- [156] N. Rajesh, R.K. Jalan, P. Hotwany, Solid phase extraction of chromium(VI) from aqueous solutions by adsorption of its diphenylcarbazide complex on an Amberlite XAD-4 resin column, *J. Hazard. Mater.* 150 (2008) 723–727. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.025.
- [157] J. Alpízar, R. López, V. Cerdà, Tratamiento de datos experimentales, First, Universitat de les Illes Balears, Servei de Publicacions i Intercanvi Científic, Palma de Mallorca, 1997.
- [158] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76 (2008) 965–977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- [159] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, Å. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, Experimental design and optimization, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40. doi:10.1016/S0169-7439(98)00065-3.
- [160] S.L.C. Ferreira, V.A. Lemos, V.S. de Carvalho, E.G.P. da Silva, A.F.S. Queiroz, C.S.A. Felix, D.L.F. da Silva, G.B. Dourado, R. V. Oliveira, Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview, *Microchem. J.* 140 (2018) 176–182. doi:10.1016/j.microc.2018.04.002.
- [161] G.L. Long, J.D. Winefordner, Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A–724A. doi: 10.1021/ac00258a001
- [162] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for analytical chemistry*, (1988).
- [163] A.S. Amin, I.A. Zaafarany, Spectrophotometric determination of bismuth after solid-phase extraction using amberlite XAD-2 resin modified with 5-(2'-bromophenylazo)-6-hydroxy pyrimidine-2,4-dione, *J. Taibah Univ. Sci.* 9 (2015) 490–497. doi:10.1016/j.jtusci.2015.01.003.
- [164] D.T. Burns, N. Tungkananuruk, S. Thuwasin, Spectrophotometric determination of bismuth after extraction of tetrabutylammonium tetraiodobismuthate(III) with microcrystalline benzophenone, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 41–44. doi:10.1016/S0003-2670(00)00996-X.
- [165] D.G. Themelis, P.D. Tzanavaras, J.K. Papadimitriou, Flow injection manifold for the direct spectrophotometric determination of bismuth in pharmaceutical products using Methylthymol Blue as a chromogenic reagent, *Analyst* 126 (2001) 247–250. doi:10.1039/B008661O.
- [166] M. Sadaaki, Y. Takashi, Equilibria of aluminium (III) complexes with methylthymol blue, *Polyhedron* 1 (1982) 405–408. doi:10.1016/S0277-5387(00)80828-1.

- [167] M. Frankowski, Simultaneous determination of aluminium, aluminium fluoride complexes and iron in groundwater samples by new HPLC–UVVIS method, *Microchem. J.* 101 (2012) 80–86. doi:10.1016/j.microc.2011.11.002.
- [168] S. Pozdniakova, A. Padaruskas, G. Schwedt, Simultaneous determination of iron(II) and iron(III) in water by capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 351 (1997) 41–48. doi:10.1016/S0003-2670(97)00331-0.
- [169] V. Neagu, I. Bunia, Acrylic weak base anion exchangers and their chemical stability in aggressive media, *Polym. Degrad. Stab.* 83 (2004) 133–138. doi:10.1016/S0141-3910(03)00234-9.
- [170] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples, *Talanta* 66 (2005) 210–217. doi: 10.1016/j.talanta.2004.11.009
- [171] 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. doi:10.1016/j.talanta.2017.07.028.
- [172] L. Zhang, X. Li, X. Wang, W. Wang, X. Wang, H. Han, Preconcentration and determination of chromium species by cloud point extraction-flame atomic absorption spectrometry, *Anal. Methods* 6 (2014) 5578–5583. doi:10.1039/C4AY00922C.
- [173] M. Almeida Bezerra, R. Erthal Santelli, L. Padua Villar, L.A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76 (2008) 965–977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- [174] W. Chen, G. Zhong, Z. Zhou, P. Wu, X. Hou, Automation of Liquid-Liquid Extraction-Spectrophotometry Using Prolonged Pseudo-Liquid Drops and Handheld CCD for Speciation of Cr(VI) and Cr(III) in Water Samples, *Anal. Sci.* 21 (2005) 1189–1193. doi:10.2116/analsci.21.1189.
- [175] M. Rosende, M. Miró, M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, V. Cerdà, Highly integrated flow assembly for automated dynamic extraction and determination of readily bioaccessible chromium(VI) in soils exploiting carbon nanoparticle-based solid-phase extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2217–2227. doi:10.1007/s00216-011-4954-y.
- [176] P.A. Sule, J.D. Ingle, Determination of the speciation of chromium with an automated two-column ion-exchange system, *Anal. Chim. Acta* 326 (1996) 85–93. doi:10.1016/0003-2670(96)00041-4.
- [177] M.C. Pannain, R.E. Santelli, On the spectrophotometric flow injection determination of chromium(VI) in natural waters after on-line preconcentration on activated alumina, *Talanta* 42 (1995) 1609–1617. doi:10.1016/0039-9140(95)01613-9.
- [178] D. de Santos, Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, *Apha-Awwa-Wpcf*, Edición. 17 (1992).

- [179] K.-H. Lee, M. Oshima, S. Motomizu, Inductively coupled plasma mass spectrometric determination of heavy metals in sea-water samples after pre-treatment with a chelating resin disk by an on-line flow injection method, *Analyst* 127 (2002) 769–774. doi:10.1039/B201210N.
- [180] B. Feist, B. Mikula, Preconcentration of heavy metals on activated carbon and their determination in fruits by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Food Chem.* 147 (2014) 302–306. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.002.
- [181] P.N. Nomngongo, J. Catherine Ngila, T.A.M. Msagati, B. Moodley, Preconcentration of trace multi-elements in water samples using Dowex 50W-x8 and Chelex-100 resins prior to their determination using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES), *Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C.* 66 (2013) 83–88. doi:10.1016/j.pce.2013.08.007.
- [182] E. Mattio, F. Robert-Peillard, C. Branger, K. Puzio, A. Margailan, C. Brach-Papa, J. Knoery, J.-L. Boudenne, B. Coulomb, 3D-printed flow system for determination of lead in natural waters, *Talanta* 168 (2017) 298–302. doi:10.1016/j.talanta.2017.03.059.
- [183] C. Calderilla, F. Maya, V. Cerdà, L.O. Leal, 3D printed device for the automated preconcentration and determination of chromium (VI), *Talanta* 184 (2018) 15–22. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.065.
- [184] A. Apilux, W. Dungchai, W. Siangproh, N. Praphairaksit, C.S. Henry, O. Chailapakul, Lab-on-Paper with Dual Electrochemical/Colorimetric Detection for Simultaneous Determination of Gold and Iron, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1727–1732. doi:10.1021/ac9022555.
- [185] J. Ruzicka, Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection, *Analyst* 125 (2000) 1053–1060. doi:10.1039/B001125H.
- [186] E. Mattio, F. Robert-Peillard, L. Vassalo, C. Branger, A. Margailan, C. Brach-Papa, J. Knoery, J.-L. Boudenne, B. Coulomb, 3D-printed lab-on-valve for fluorescent determination of cadmium and lead in water, *Talanta* 183 (2018) 201–208. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.051.
- [187] H. Wang, D.J. Cocovi-Solberg, B. Hu, M. Miró, 3D-Printed Microflow Injection Analysis Platform for Online Magnetic Nanoparticle Sorptive Extraction of Antimicrobials in Biological Specimens as a Front End to Liquid Chromatographic Assays, *Anal. Chem.* 89 (2017) 12541–12549. doi:10.1021/acs.analchem.7b03767.
- [188] M.N. Costa, B. Veigas, J.M. Jacob, D.S. Santos, J. Gomes, P.V. Baptista, R. Martins, J. Inácio, E. Fortunato, A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper, *Nanotechnology* 25 (2014) 94006. doi:10.1088/0957-4484/25/9/094006
- [189] M. Granica, M. Fiedoruk-Pogrebniak, R. Koncki, Ł. Tymecki, Flow injection analysis in lab-on-paper format, *Sensors Actuators B Chem.* 257 (2018) 16–22. doi:10.1016/j.snb.2017.10.088.
- [190] C.-K. Su, W.-C. Chen, 3D-printed, TiO₂ NP–incorporated minicolumn coupled

- with ICP-MS for speciation of inorganic arsenic and selenium in high-salt-content samples, *Microchim. Acta* 185 (2018) 185:268. doi:10.1007/s00604-018-2812-8.
- [191] M. Wierucka, M. Biziuk, Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples, *TrAC Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 50–58. doi:10.1016/j.trac.2014.04.007.
- [192] R.B. Dominguez, G.A. Alonso, R. Muñoz, A. Hayat, J.-L. Marty, Design of a novel magnetic particles based electrochemical biosensor for organophosphate insecticide detection in flow injection analysis, *Sensors Actuators B Chem.* 208 (2015) 491–496. doi:10.1016/j.snb.2014.11.069.
- [193] C. Vakh, M. Alaboud, S. Lebedinets, D. Korolev, V. Postnov, L. Moskvina, O. Osmolovskaya, A. Bulatov, An automated magnetic dispersive micro-solid phase extraction in a fluidized reactor for the determination of fluoroquinolones in baby food samples, *Anal. Chim. Acta* 1001 (2018) 59–69. doi:10.1016/j.aca.2017.11.065.
- [194] F. Maya, C. Palomino Cabello, J.M. Estela, V. Cerdà, G. Turnes Palomino, Automatic in-syringe dispersive microsolid phase extraction using magnetic metal–organic frameworks, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7545–7549. doi:10.1021/acs.analchem.5b01993
- [195] A. González, J. Avivar, F. Maya, C. Palomino Cabello, G. Turnes Palomino, V. Cerdà, In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbon microparticles obtained from zeolitic imidazolate frameworks, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 225–234. doi:10.1007/s00216-016-9988-8.
- [196] I.S. Barreto, S.I.E. Andrade, F.A.S. Cunha, M.B. Lima, M.C.U. Araujo, L.F. Almeida, A robotic magnetic nanoparticle solid phase extraction system coupled to flow-batch analyzer and GFAAS for determination of trace cadmium in edible oils without external pretreatment, *Talanta* 178 (2018) 384–391. doi:10.1016/j.talanta.2017.09.063.
- [197] D.A.V. Medina, Á.J. Santos-Neto, V. Cerdà, F. Maya, Automated dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of the organic phase, *Talanta* 189 (2018) 241–248. doi:10.1016/j.talanta.2018.06.081.
- [198] Y. Chao, X. Zhang, L. Liu, L. Tian, M. Pei, W. Cao, Determination of hydroquinone by flow injection chemiluminescence and using magnetic surface molecularly imprinted particles, *Microchim. Acta* 182 (2015) 943–948. doi:10.1007/s00604-014-1415-2.
- [199] H. Wu, N. Gao, L. Zhang, Y. Li, Y. Shi, L. Du, Automated Magnetic Solid-Phase Extraction for Synthetic Food Colorant Determination, *Food Anal. Methods* 9 (2016) 614–623. doi:10.1007/s12161-015-0219-2.
- [200] M.C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Stir Membrane Extraction: A Useful Approach for Liquid Sample Pretreatment, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8957–8961. doi:10.1021/ac9016192.
- [201] M. Ghani, M. Saraji, F. Maya, V. Cerdà, Automated multisyringe stir bar sorptive extraction using robust montmorillonite/epoxy-coated stir bars, *J. Chromatogr. A*

- 1445 (2016) 10–18. doi:10.1016/j.chroma.2016.03.081.
- [202] D.F. Hagen, C.G. Markell, G.A. Schmitt, D.D. Blevins, Membrane approach to solid-phase extractions, *Anal. Chim. Acta* 236 (1990) 157–164. doi:10.1016/S0003-2670(00)83309-7.
- [203] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Interfacing on-line solid phase extraction with monolithic column multisyringe chromatography and chemiluminescence detection: An effective tool for fast, sensitive and selective determination of thiazide diuretics, *Talanta* 80 (2010) 1333–1340. doi:10.1016/j.talanta.2009.09.033.
- [204] A. Anthemidis, V. Kazantzi, V. Samanidou, A. Kabir, K.G. Furton, An automated flow injection system for metal determination by flame atomic absorption spectrometry involving on-line fabric disk sorptive extraction technique, *Talanta* 156–157 (2016) 64–70. doi:10.1016/j.talanta.2016.05.012.
- [205] M. Ghani, M.F. Font Picó, S. Salehinia, C. Palomino Cabello, F. Maya, G. Berlier, M. Saraji, V. Cerdà, G. Turnes Palomino, Metal-organic framework mixed-matrix disks: Versatile supports for automated solid-phase extraction prior to chromatographic separation, *J. Chromatogr. A* 1488 (2017) 1–9. doi:10.1016/j.chroma.2017.01.069.
- [206] C. Palomino Cabello, M.F.F. Picó, F. Maya, M. del Rio, G. Turnes Palomino, UiO-66 derived etched carbon/polymer membranes: High-performance supports for the extraction of organic pollutants from water, *Chem. Eng. J.* 346 (2018) 85–93. doi:10.1016/j.cej.2018.04.019.
- [207] M. Ghani, C. P. Cabello, M. Saraji, J. M. Estela, V. Cerdà, G. Turnes Palomino, F. Maya, Automated solid-phase extraction of phenolic acids using layered double hydroxide–alumina–polymer disks, *J. Sep. Sci.* 0 (2018) 2013–2018. doi:10.1002/jssc.201701420.
- [208] J.C. Masini, F. Svec, Porous monoliths for on-line sample preparation: A review, *Anal. Chim. Acta* 964 (2017) 24–44. doi:10.1016/j.aca.2017.02.002.
- [209] P. Chocholouš, P. Solich, D. Šatínský, An overview of sequential injection chromatography, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 129–135. doi:10.1016/j.aca.2007.02.018.
- [210] J.C. Masini, Separation of proteins by cation-exchange sequential injection chromatography using a polymeric monolithic column, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 1445–1452. doi:10.1007/s00216-015-9242-9.
- [211] L.F. Ribeiro, J.C. Masini, Complexing porous polymer monoliths for online solid-phase extraction of metals in sequential injection analysis with electrochemical detection, *Talanta* 185 (2018) 387–395. doi:10.1016/j.talanta.2018.03.099.
- [212] M. Ghani, F. Maya, V. Cerdà, Automated solid-phase extraction of organic pollutants using melamine-formaldehyde polymer-derived carbon foams, *RSC Adv.* 6 (2016) 48558–48565. doi:10.1039/C6RA08230K.
- [213] M. del M. Darder, S. Salehinia, J.B. Parra, J.M. Herrero-Martinez, F. Svec, V.

- Cerdà, G. Turnes Palomino, F. Maya, Nanoparticle-Directed Metal–Organic Framework/Porous Organic Polymer Monolithic Supports for Flow-Based Applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 1728–1736. doi:10.1021/acsami.6b10999.
- [214] M. Serrano, M. Bartolomé, J.C. Bravo, G. Paniagua, J. Gañan, A. Gallego-Picó, R.M. Garcinuño, On-line flow injection molecularly imprinted solid phase extraction for the preconcentration and determination of 1-hydroxypyrene in urine samples, *Talanta* 166 (2017) 375–382. doi:10.1016/j.talanta.2016.01.048.
- [215] M. Farré, S. Pérez, C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, D. Barceló, Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1347–1362. doi:10.1016/j.trac.2010.07.016.
- [216] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. doi:10.1016/j.trac.2013.04.010.
- [217] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 2–8. doi:10.1016/j.trac.2014.12.011.

Anexos

Anexo 1

Publicaciones

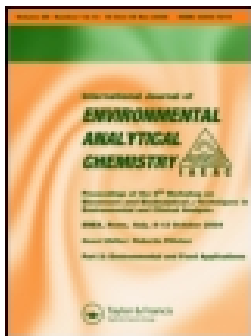
Contenido

- 1-Multivariate optimization of a rapid and simple automated method for bismuth determination in well water samples exploiting long path length spectrophotometry (International Journal of Environmental Analytical Chemistry 96,2016, 653-666)
 - 2-3D printed device including disk-based solid-phase extraction for the automated speciation of iron using the multisyringe flow injection analysis technique (Talanta 175, 2016,463-469)
 - 3-3D printed device for the automated preconcentration and determination of chromium (VI) (Talanta 184, 2018, 15-22)
 - 4-Recent advances in flow-based automated solid phase extraction (Trends in Analytical chemistry)
-

Participaciones en congresos

Contenido

- ICFIA 2016: Certificado de asistencia
 - ICFIA 2017: 3D printed extraction device with integrated features for the automated determination of chromium (VI)
 - ICFIA 2017: 3D printed integrated device for disk-based automated solid-phase extraction
 - VI Jornadas doctorales G9: Dispositivos impresos 3D para la extracción basada en disco para la determinación espectrofotométrica de metales
-



Multivariate optimisation of a rapid and simple automated method for bismuth determination in well water samples exploiting long path length spectrophotometry

Carlos Calderilla, Jessica Avivar, Luz O. Leal & Víctor Cerdà

To cite this article: Carlos Calderilla, Jessica Avivar, Luz O. Leal & Víctor Cerdà (2016): Multivariate optimisation of a rapid and simple automated method for bismuth determination in well water samples exploiting long path length spectrophotometry, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, DOI: [10.1080/03067319.2016.1180378](https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1180378)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2016.1180378>



Published online: 10 May 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Multivariate optimisation of a rapid and simple automated method for bismuth determination in well water samples exploiting long path length spectrophotometry

Carlos Calderilla^a, Jessica Avivar^b, Luz O. Leal^a and Víctor Cerdà^{b,c}

^aEnvironment and Energy Department, Advanced Materials Research Center, Chihuahua, Mexico; ^bSciware Systems, S.L. Spin-off from the University of the Balearic Islands, Bunyola, Spain; ^cLaboratory of Environmental Analytical Chemistry—LQA2, University of the Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain

ABSTRACT

An automated spectrophotometric system is proposed for the determination of bismuth in well water samples, using multi-syringe flow injection analysis (MSFIA) and exploiting a liquid waveguide capillary cell (LWCC). This method is based on the colorimetric reaction of bismuth and methylthymol blue (MTB) in the presence of polyvinylpyrrolidone (PVP) in acid medium ($0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$). The Bi(III)–MTB complex was measured at 600 nm. The method was optimised by multivariate techniques. Some figures of merit of the proposed system are worth being highlighted, such as its wide linear working range (between 4.9 and $600 \mu\text{g L}^{-1}$), its low detection limit ($1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ of bismuth) and its high intra-day precision and inter-day precision (0.7% ($n = 12$) and 1.4% ($n = 5$), respectively, both expressed as RSD). Moreover, a high injection frequency of 30 h^{-1} is achieved, as the proposed analyser is a powerful tool for fast Bi(III) determination. The method developed was successfully validated by analysing reference samples (pharmaceutical samples) by comparing the results with those obtained by ICP-OES and it was satisfactorily applied to well water samples. Besides, the present system is miniaturised allowing in situ measurements in control processes and field analysis.

ARTICLE HISTORY

Received 12 November 2015
Accepted 8 April 2016

KEYWORDS

bismuth; long path spectrophotometry; multi-syringe flow injection analysis (MSFIA); methylthymol blue (MTB); environmental water samples; automation

1. Introduction

Bismuth is a trace element present in the environment as bismuthinite (Bi_2S_3), bismite (Bi_2O_3) and bismuth sulphide-telluric ($\text{Bi}_2\text{Te}_2\text{S}$), associated with minerals of lead, copper and tin [1]. The natural abundance of bismuth is 0.2 mg L^{-1} [2]. Bismuth levels in environmental matrices are usually in the parts per million (mg L^{-1}) or parts per billion ($\mu\text{g L}^{-1}$). In soil samples it is at $1 \mu\text{g g}^{-1}$, in sediments in the range of $0.07\text{--}49.6 \text{ mg g}^{-1}$ [3]. Bismuth compounds are used in cosmetics, nanomaterials, medical treatments and its radioisotopes for tumours treatment [4]. Bismuth is widely used as active ingredient in pharmaceutical preparations, e.g. in treatments for gastrointestinal diseases [5], given its low toxicity and the high therapeutic efficacy and few side effects of its compounds.

Thus, given its widespread use, it is necessary to have fast and robust methods for bismuth determination, which can be used as control tools for bismuth monitoring.

Different methods for bismuth determination can be found in the literature, exploiting various detection techniques, such as thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) [6], inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) [7], inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [8], luminescence [1] and UV-vis spectrophotometry [9–12]. UV-vis spectrophotometric detection is an affordable technique that provides good precision, and the possibility to obtain miniaturised portable systems. Furthermore, long path length capillary cells permit us to increase sensitivity and improve detection limits. Liquid waveguide capillary cells (LWCCs) have been widely used to determine environmental contaminants at trace levels [13–15]. LWCCs are based on the use of a capillary with a lower refractive index than the liquid core contained in it, so the light introduced into the liquid core of the capillary is totally internally reflected down the capillary towards the detector, detecting as much of the optical signal as possible while minimising background noise [16].

A number of colour reagents have been employed for bismuth determination, e.g. methylthymol blue (MTB) [9], xlenol orange [10], *N*-(2-acetamide)iminodiacetic acid [17] and lead tetramethylenedithiocarbamate [18]. MTB has higher affinity for ions with higher charge, having greater affinity for ions with oxidation state (III) [19]. For instance, MTB can form complexes with aluminium (III) [20], zirconium, hafnium and bismuth [21] in acid medium. MTB can be used selectively for bismuth determination since the complex has different maximum absorbance's wavelengths for the above-cited metals and also different reaction media are required, e.g. in the case of iron (III), the maximum of absorbance of the 1:2 Fe(III)–MTB complex is at the same wavelength as the bismuth (III) complex but it reacts at a different pH, i.e. pH 6 [22]. However, if samples with high iron content are analysed, further masking agents will be required to avoid the interference of the 1:1 Fe(III)–MTB complex.

Modern analytical strategies tend towards automation and miniaturisation. In this context, the use of flow analysis techniques for automation has provided a number of enhanced analytical methods affording high throughput, higher precision, lower reagents consumption and waste generation [23,24]. Spectrophotometric determination of bismuth has been previously automated using flow injection analysis (FIA) [25], sequential injection analysis (SIA) [9] and multi-commuted flow injection analysis (MCFIA) [10]. Multi-syringe flow injection analysis (MSFIA) combines the benefits of the aforementioned techniques, such as the multi-channel operation and high injection throughput of FIA, together with the robustness and versatility of SIA and MCFIA [23,26]. Therefore, we implemented a MSFIA-LWCC system for bismuth determination.

Multivariate experimental design combined with the concepts of multiple response treatments and desirability function permit simultaneous, quick and efficient optimisation. By exploiting multivariate optimisation techniques not only single factors affecting the response signal are studied but also interactions between them [27]. Furthermore, a global knowledge of the system is achieved involving a small number of experiments. As a general rule, when the experimental variables and the responses have been defined, the experiments can be planned and performed in such a way that a maximum of information is gained from a minimum of experiments. Moreover, a useful tool for multi-response evaluation, i.e. minimise the blank signal while maximising as much as possible

the response signal, is the desirability function, which allows the simultaneous optimisation of more than one response, finding the best compromise for all of them [28].

Therefore, we present a simple and rapid method for bismuth determination in well water samples. The combining of multi-syringe flow injection analysis and LWCC makes of the present system a powerful tool for in situ bismuth determination, aiming to develop an environmentally friendly and low-cost bismuth analyser.

2. Experimental

2.1. Reagents

All solutions were prepared from analytical grade reagents and Millipore quality water. Bismuth standards were prepared from a standard solution of $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ of bismuth (Scharlau, Barcelona, Spain) by dilution in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$. Other reagents used were: HNO_3 (65% Scharlau, Barcelona, Spain), methylthymol blue (MTB) – sodium salt (Panreac, Madrid, Spain), polyvinylpyrrolidone (Fluka, Switzerland), aluminium nitrate nonahydrate (Merck, Darmstadt, Germany), EDTA, ascorbic acid, sodium fluoride (96%), hydrofluoric acid (48%), sodium chloride and iron nitrate nonahydrate (Scharlau).

The chromogenic reagent solution was prepared by dissolving the required amount of MTB in an aqueous solution containing 6 g L^{-1} of polyvinylpyrrolidone (PVP).

2.2. Samples

All samples were prepared in a final solution of $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$.

The proposed method was applied to well water samples from Palma de Mallorca (Spain). In order to validate the proposed method, pharmaceutical samples were analysed. These contained different bismuth compounds such as bismuth subgallate (cream 'synalar rectal'), bismuth gluconate (liquid-injectable solution 'Labcatal') and bismuth subcitrate (tablet 'gastrodenol').

Well water samples and the liquid-injectable solution did not require digestion these were just acidified prior being processed. Solid samples (tablet and cream) were weighed, tablets were ground by a mortar to homogenise, prior microwave digestion in a microwave oven (MLS-1200 Mega- Milestone). Thus, 0.2 mg of sample were mixed with 10 mL of nitric acid (65%) and the following microwave digestion programme was used: 6 min at 250 W , 6 min at 400 W , 6 min at 650 W , 6 min at 250 W and 10 min without power supply. The clear digests were heated again to near-dryness and diluted in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ to the required volume for analysis.

2.3. Manifold and software

The MSFIA-LWCC spectrophotometric system for Bi determination is shown in [Figure 1](#). The developed analyser is based on the use of a multi-syringe burette (BU4S; Crison Instruments, Barcelona, Spain), which can simultaneously handle up to four syringes. Each syringe has a three-way solenoid valve at the head (N-Research, Caldwell, NJ, USA), allowing the injection of the reagents and sample to the system only when required and their return to their reservoirs when not. This system used three glass

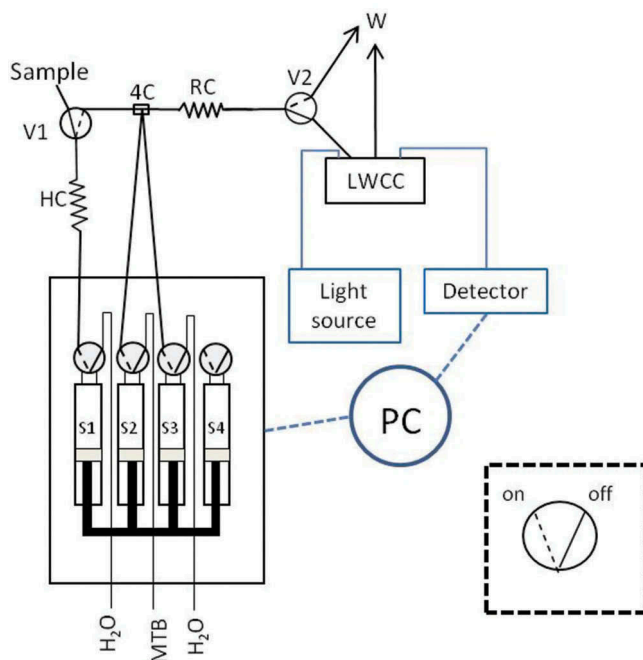


Figure 1. Schematic depiction of the developed MSFIA-LWCC bismuth analyser. 4C, four-way connector; HC, holding coil; LWCC, liquid waveguide capillary cell; PC, personal computer; RC, reaction coil; S, syringe; V, external solenoid valve; W, waste.

syringes of 10 (S1), 5 (S2) and 10 (S3) mL (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). Syringe S1 is used for sample injection containing the carrier (H_2O), S2 dispenses the colorimetric reagent and S3 drives the reaction product to the detector. The system has two external three-way solenoid valves (V1, V2) (Takasago Electric Inc., Nagoya, Japan), which direct the flow in the desired way, i.e. on: to the detector; off: to waste.

The flow network was constructed with PTFE (polytetrafluoroethylene) tubing of 1.5 mm i.d. for reagents and sample load position, and 0.8 mm i.d. for the rest of the system. A holding coil (HC) with a volume of 1 mL was connected to S1 and used for sample loading. A reaction coil (RC) was used to mix the reaction plug. A four-way connector made of PMMA (polymethylmethacrylate) was also implemented.

The detection system was constituted by a miniaturised spectrometer USB 2000 (Ocean Optics, USA), connected to a computer via an USB interface coupled to a liquid waveguide capillary cell-LWCC (World Precision Instruments, Inc. FL USA) made from a 1 m type II Teflon AF (550 μm i.d., 100.0 ± 0.5 cm effective path length and 240 μL internal volume). Two optical fibres of 400 and 600 μm i.d. (Ocean Optics) were used to connect the deuterium-halogen light source (DH-2000, Ocean Optics) used, the LWCC and the detector.

Samples were also analysed by an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES, Optima 5300DV, Perkin Elmer Inc.).

Instrumental control, data acquisition and processing were done with the software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems, Bunyola, Spain). The distinctive feature of this software based on dynamic link libraries (DLLs) at 32 bits is the possibility of using a single

and versatile application without further modification for whatever instrumentation and detection system needed.

Optimisation was made in a multivariate approach using the software Statistica 6 (Statsoft, USA).

2.4. Analytical procedure

The analytical protocol for bismuth determination is described in Table 1 and summarised as follows. First the tube of the liquid located between reservoir of the sample and V1 is conditioned and filled with the new sample to avoid cross-contamination. Then the sample is loaded into the holding coil (HC), with V1 in 'off'. Afterwards, syringes S1 and S2 are activated (dispense in 'on' position) to simultaneously dispense and mix the sample and the colorimetric reagent solution in the reaction coil (RC). Finally, the mixture is pushed towards the detector with water (syringe S3 dispense in 'on') to be quantified.

2.5. Optimisation of experimental conditions

The experimental operating conditions of the developed method for bismuth determination were optimised through experimental design exploiting the computer statistic package Statistica. First, a screening method was applied to find the parameters affecting significantly the analytical response and to discard those with negligible effects upon it. Five variables were included in this first study, namely: the flow rate, the length of the reaction coil, concentration of MTB, volume of MTB and sample volume. The screening was carried out applying a 2^k full factorial design taking into account the effects of individual variables and their second-order interactions. The Pareto chart is commonly used to represent in a graphical way the standardised effect of each variable and their interactions. A red line sets the limit to consider if a variable has a significant effect upon the analytical response or not. Variables and interactions are ordered from the highest to the lowest significant, also showing the standardised effect in labels.

Once the variables with a significant effect upon the response signal were selected, a face centred central composite design including quadratic terms was performed. The

Table 1. Analytical procedure of the MSFIA-LWCC for bismuth determination.

Step	Operation	Flow rate (mL min ⁻¹)	Syringe (S1)	Syringe (S2)	Syringe (S3)	External valve (V1)	External valve (V2)
Sample change							
	Tubing cleaning						
	(a) Pick up 0.7 mL	1.5	On	Off	Off	Off	Off
	(b) Dispense 1.0 mL	1.5	On	Off	Off	On	On
	(c) Pick up 0.2 mL	1.5	On	Off	Off	Off	Off
	(d) Dispense 0.2 mL	1.5	On	Off	Off	On	On
	Coil cleaning						
	Dispense 1.5 mL	1.5	Off	Off	On	Off	On
Sample loading							
	Pick up 0.5 mL	1.5	On	Off	Off	Off	Off
Reaction and injection in the detector							
	(a) Dispense 0.5 mL	1.5	On	On	Off	On	Off
	(b) Dispense 2.0 mL	5	Off	Off	On	Off	Off

desirability function was used in order to find a compromise between the lowest blank signal and the highest Bi(III)–MTB complex signal. The desirability function is a useful tool to treat more than one response and to find a compromise between them. This function, proposed by Derringer and Suich [28], transforms predicted values, i.e. calculated with the mathematical model equation, from each response into a dimensionless scale (0–1). The overall desirability is calculated by determining the geometric mean of individual desirabilities. Then goals are set for each individual response, i.e. 1 is given to the wanted response and 0 to the undesirable response.

All optimisation studies included three centre points. The ranges of the variables used in the experimental design are listed in Table 2.

The sample medium was fixed at $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ according to previous studies [9].

3. Results and discussion

3.1. Chemical conditions and system set-up

MSFIA is a very versatile flow technique allowing parallel operations. Moreover, its coupling to LWCC provides lower detection limits improving the sensitivity of the developed method for bismuth determination. Furthermore, the developed MSFIA-LWCC system is compact and miniaturised, being portable for in situ measurements.

The absorbance of the coloured Bi(III)–MTB complex was measured at 600 nm. The Bi(III)–MTB complex can be measured at 548 and 600 nm; we measured at 600 nm because there was a greater difference between the blank and the complex signal. The correction wavelength used was 760 nm.

In previous works PVP was used to increase the solubility of the chromogenic reagent [9,29]. Thus, the effect of PVP was evaluated at two different wavelengths, i.e. 548 and 600 nm. As can be seen in Table 3, in the presence of PVP the colorimetric reaction showed increased sensitivity and bathochromic effect, showing a higher net absorbance at 600 nm and allowing the elimination of possible interferences. Thus, 6 g L^{-1} of PVP [9] were added in further studies. In previous works it has been reported that the formation of Bi(III)–MTB complex takes 5 s [9]; in this method the reaction time is studied depending on the length of the reaction coil.

3.2. Optimisation of the MSFIA-LWCC method for bismuth determination

The experimental design was built in a dimensionless coordinate system using factor coding, wherein the highest and lowest levels are given as +1 and –1, respectively. For the screening, a full factorial 2^5 design was carried out with a total of 35 experiments

Table 2. Experimental domains and optimum values obtained by multivariate optimisation of the proposed method.

Variable	Range screening	Range central composite	Critical values
Concentration of MTB ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1–7	1–6	6
Volume of MTB (mL)	0.1–0.5	0.1–0.4	0.25
Sample volume (mL)	0.2–1	0.1–0.8	0.5
Flow rate (mL min^{-1})	1–2	1.5	1.5
Length of reaction coil (cm)	25–100	100–200	100

Table 3. Study of the effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) at two different wavelengths.

PVP added		548 nm	600 nm
0	Blank	0.0675	0.0213
	Bi(III)–MTB complex	0.7409	1.1435
	Net absorbance	0.6734	1.1222
6 g L ⁻¹	Blank	0.2343	0.0954
	Bi(III)–MTB complex	0.8573	1.2825
	Net absorbance	0.6230	1.1871

including 3 centre points. Results showed that the five variables, their interactions except sample volume – flow rate, and the curvature were significant in the studied experimental domain using a three-way interaction model, as can be seen in the Pareto chart (Figure 2). However, the desirability function (Figure 3) was studied to observe the global effect of the variables upon the analytical signal and the flow rate showed a minimal effect on the signal. Thus, it was set at 1.5 mL min⁻¹ to prevent overpressure in the system guaranteeing the maximum sample throughput. Ranges of the other four variables were modified according to results observed in the screening, i.e. the MTB concentration and volume were lowered in order to minimise the blank signal, the sample volume was also slightly modified because its increase affected the MTB-complex response more, and the RC length range was increased as a higher ratio (complex signal divided by blank signal) was attained at the highest length studied. Optimum values were obtained by a central composite design including quadratic terms (Table 2), performing a total of 27 experiments. The desirability function (d) was studied for the blank, the Bi(III)–MTB product and

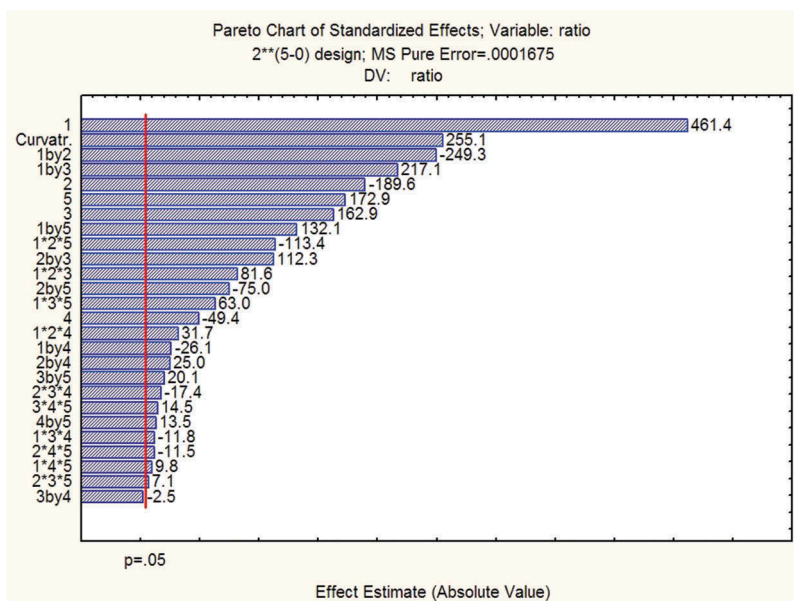


Figure 2. Pareto chart of the 2⁵ screening for five variables analysing the ratio between the analytical response and the blank. The red line sets the limit to consider if a variable has a significant effect upon the analytical response or not ($p = 0.05$). 1, MTB concentration; 2, MTB volume; 3, sample volume; 4, flow rate; 5, RC length; X by Y, two-way interaction (representing X and Y, the interacting variables); X × Y × Z, three-way interaction (representing X, Y and Z, the interacting variables).

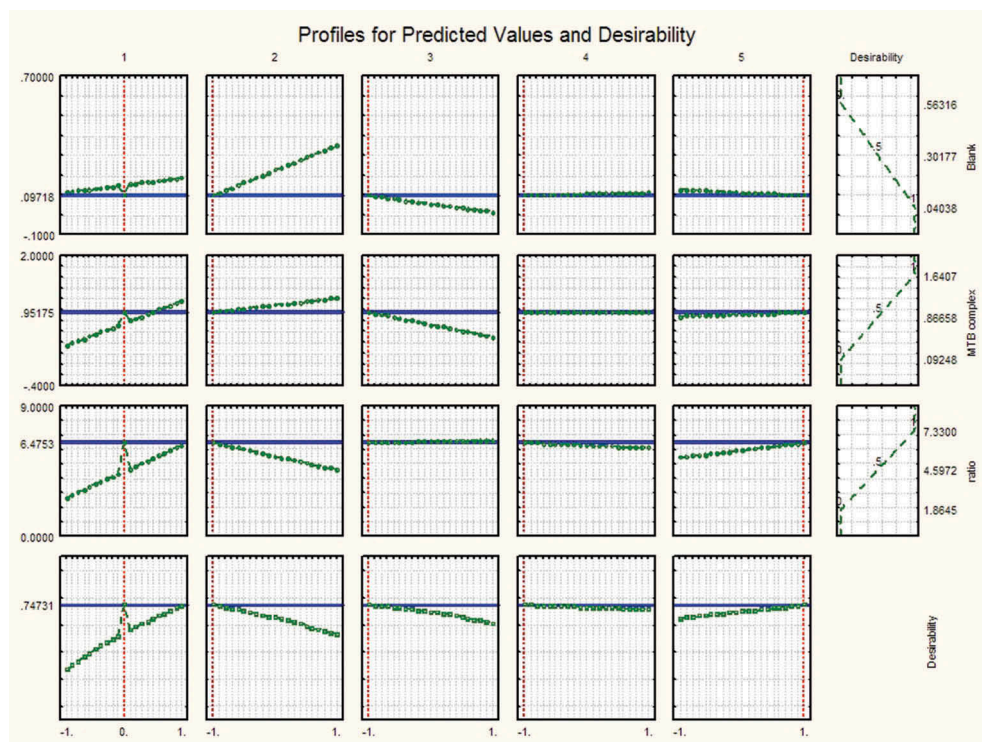


Figure 3. Desirability chart of the screening for the blank, the Bi–MTB product and the ratio between them. Plotting from left to right: the MTB concentration, the MTB volume, the sample volume, the flow rate and the RC length; and from up to down: the response signal for the blank, the Bi(III)–MTB complex, the ratio between the complex signal and the blank signal and finally the desirability function aiming to find a compromise between the lowest blank signal and the maximum complex signal. The red line shows the critical value for each variable according to the desirability. The green line shows the experimental data and the blue line the best value obtained according to the goals established. 1, MTB concentration; 2, MTB volume; 3, sample volume; 4, flow rate; 5, RC length.

the ratio between them (Figure 4). As stated before, we aimed to reach the highest net absorbance, so $d = 1$ was set to the highest complex signal, the ratio and the lowest blank signal. As can be seen in Figure 4, the sample volume showed a maximum for the ratio and the Bi(III)–MTB signal and a minimum for the blank at 0.15, codified value, corresponding to 0.5 mL. The MTB concentration showed a maximum positive effect at the highest level studied for the Bi(III)–MTB complex and for the ratio whereas the blank showed no significant differences in the studied range. The MTB volume and the reaction coil length had no significant effect upon the response signal in the studied range. However, the Bi(III)–MTB complex and the blank did increase with the chromogenic reagent volume. Thus, the ratio was studied and the central studied level was selected as the optimum value, since the blank does not significantly increase up to this volume. The optimum value for the reaction coil length was the minimum length studied, since the signal decreases when increasing its length due to dispersion of the reaction plug. Therefore, a 100-cm-long reaction coil was selected for further assays. Critical values of the studied variables are shown in Table 2.

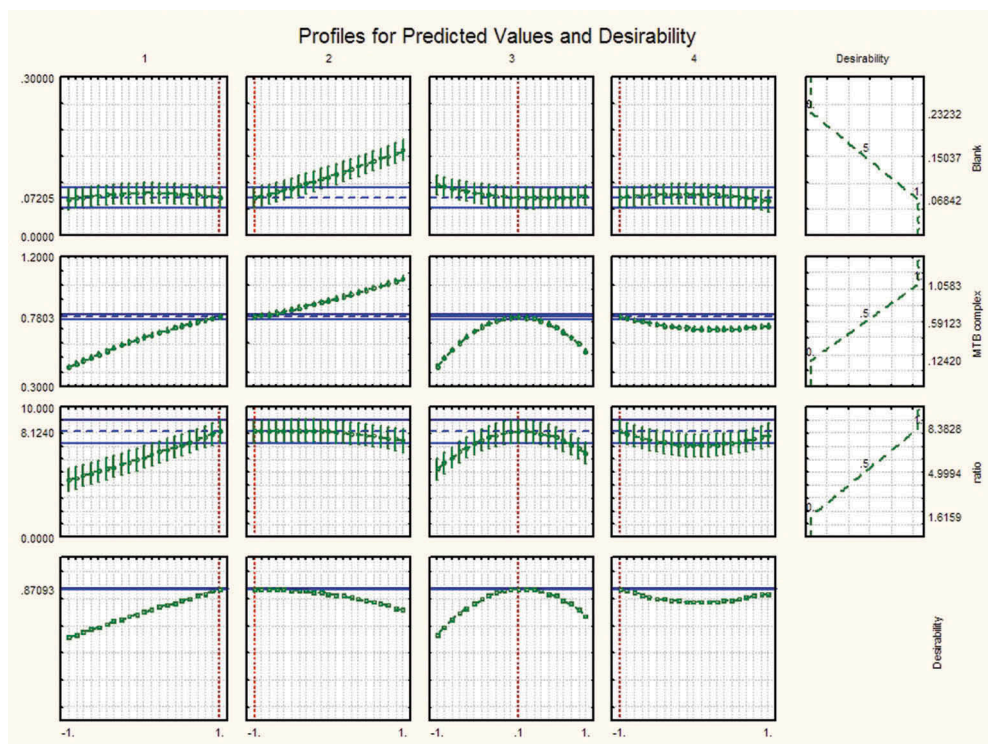


Figure 4. Desirability chart of the face centred central composite design for the blank, the Bi–MTB product and the ratio between them. Plotting from left to right: the MTB concentration, the MTB volume, the sample volume and the RC length; and from up to down: the response signal for the blank, the Bi(III)–MTB complex, the ratio between the complex signal and the blank signal, and finally the desirability function aiming to find a compromise between the lowest blank signal and the maximum complex signal. The red line shows the critical value for each variable according to the desirability. The green line shows the experimental data and the blue line the best value obtained according to the goals established. 1, MTB concentration; 2, MTB volume; 3, sample volume; 4, RC length.

3.3. Analytical parameters

In order to evaluate the performance of the proposed MSFIA-LWCC method, its figures of merit were studied.

The calibration curve for bismuth determination (net absorbance versus bismuth concentration in $\mu\text{g L}^{-1}$) was obtained with a statistically satisfactory fit ($y = 0.0018x + 0.0249$, $R^2 = 0.9982$, $n = 8$). A wide linear working range was accomplished, i.e. 4.9–600 $\mu\text{g L}^{-1}$ and the limit of detection (LOD) obtained was 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Table 4). This LOD was calculated as three times the standard deviation of 10 replicates of the blank divided by the slope of the calibration curve, according to the IUPAC [30,31]. The intra-day precision was evaluated as the relative standard deviation (RSD) from 12 successive injections of 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ of bismuth and the inter-day precision was calculated from results obtained on different working days ($n = 5$). Results were 0.7% and 1.4%, respectively. An injection frequency of 30 h^{-1} was attained with the proposed analyser.

Table 4. Comparison of the present method with previous method for Bi determination by spectrophotometric detection.

Chromogenic reagent	Detection	Flow technique	Concentration chromogenic reagent (mol L ⁻¹)	Volume chromogenic reagent (mL)	Linear working range (µg L ⁻¹)	Detection Limit (µg L ⁻¹)	Precision RSD (%)	Injection Frequency (h ⁻¹)	Reference
Methylthymol blue	Spectrophotometric	SIA	5×10^{-4}	0.15	825–75,000	250	1.1	72	[9]
Methylthymol blue	Spectrophotometric	FIA	7.08×10^{-4}	–	495–100,000	150	1.3	–	[25]
Xylenol Orange	Spectrophotometric-Sensor sol-gel	MCFIA	2×10^{-3}	–	125–875	7	0.8	42	[10]
5-(2-bromophenylazo)-6-hydroxy pyrimidine-2,4-dione	Spectrophotometric-SPE	Manual	2×10^{-3}	1.2	250–7500	31	1.65	–	[11]
Methylthymol blue method	Spectrophotometric-LWCC	MSFIA	6×10^{-6}	0.25	4.9–600	1.5	0.7	30	Proposed

As can be seen in Table 4, the detection limit obtained is lower than that obtained by Amin *et al.* [11], exploiting solid phase extraction prior spectrophotometric detection reaching an LOD 20 times higher ($31 \mu\text{g L}^{-1}$) than the one achieved with the proposed method. Also, the use of solid phase extraction (SPE) decreases the injection frequency.

Regarding other automated methods exploiting flow techniques and spectrophotometric detection, the consumption of the chromogenic reagent in the present method is lower or similar to that observed for other automated methods, as can be seen in Table 4. The LOD is 4.5 times lower than the one reported using an MCFIA method [10], 167 times lower than in the SIA method [9] and 100 times lower than in the FIA method [25].

Furthermore, the proposed method has a higher precision and is more miniaturised, given the small size of the spectrophotometer used. However, the injection throughput is lower than in previously reported methods because of the washing of the system to prevent contamination between samples and the lower flow rate used due to the LWCC. Nonetheless, the sensitivity increase is remarkable and the injection throughput is still high.

3.4. Interferences

As cited above, the MTB has higher affinity for ions with higher charge, having greater affinity for ions with oxidation state (III) [19]. MTB can form complexes with several metals but taking into account the medium and the absorption wavelength, only Al^{3+} and Fe^{3+} were selected as potential interfering ions since these could give a positive interference. Also, it has been reported that the ion chloride can produce a negative interference by masking the bismuth [9]. Thus, the effect of these interfering ions for the determination of bismuth was studied. The criterion for interference was established in $\pm 10\%$ of the analytical response.

Aluminium concentration has been reported to be at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ in well water [32]. Solutions containing $250 \mu\text{g L}^{-1}$ of bismuth were prepared, adding increasing amounts of the potential interfering ions. Al^{3+} and Cl^{-} showed no significant interference in the concentration ranges of 0–1 and 0–60 mg L^{-1} , respectively.

The concentration of iron in well water is between 1 and 2 mg L^{-1} ; this data was used as reference value to evaluate its interfering degree [32]. The ion Fe^{3+} presented interference at $200 \mu\text{g L}^{-1}$, requiring the use of ascorbic acid as masking agent. Thus, by adding $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ of ascorbic acid, the level of tolerance was raised up to 2 mg L^{-1} of Fe^{3+} .

3.5. Application of the developed MSFIA-LWCC method for Bi determination in well water samples and validation

The applicability of the proposed automated method was evaluated by analysing three well water samples from different locations in Palma de Mallorca (Spain). As can be seen in Table 5, a concentration of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ was found in these samples and satisfactory recoveries were obtained in the add-recovery test with the proposed method.

Table 5. Analysis of well water samples with the proposed method.

Sample	Water samples		Recovery (%)
	Bismuth added ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Bismuth found ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Well water 1	0	53 ± 5	–
	50	102 ± 8	98.4
Well water 2	0	59 ± 3	–
	50	105 ± 5	90.1
Well water 3	0	51 ± 4	–
	50	99 ± 2	94.9

Moreover, in order to validate the present method, different reference samples (pharmaceutical samples) were analysed. These samples were analysed with the proposed system and by ICP-OES performing three replicates. Results are shown in Table 6. As can be seen, the t -values obtained were all below the critical value. Thus, no significant differences at the 95% confidence level were obtained between the values found by the proposed method and by ICP OES. Thus, these results together with the good recoveries achieved in well water samples validate the present method for bismuth determination.

4. Conclusions

A new low-cost and miniaturised analyser for bismuth determination exploiting multi-syringe flow injection analysis and long path length spectrophotometry has been developed. The use of multivariate optimisation combined with the desirability function allowed the effective optimisation of the proposed bismuth analyser. The automation of the proposed system by MSFIA provides a decrease of reagents consumption and makes of this method a potential, simple, fast and low-cost control tool for bismuth determination in well water samples.

One of the main advantages of the developed automated method is the miniaturisation achieved, which allows its in situ utilisation for monitoring purposes and in field measurements. Moreover, the methodology accomplished is more economical and environmentally friendly in comparison with previous automated methods for Bi(III) determination.

The applicability of the developed system as bismuth analyser in well water samples has been validated by its application to well water samples from Mallorca and the good results obtained in the add-recovery test. Furthermore, the method was successfully validated using reference samples.

Table 6. Application of the proposed method to reference samples (pharmaceutical) and comparison to ICP-OES results. $F_{\text{crit}} = 19$, $t_{\text{crit}} = 2.92$ ($n = 3$) 95% confidence level.

Sample	Bismuth concentration			Comparison test	
	Theoretical content	Proposed method	ICP-OES	F_{obs}	t_{obs}
Synalar rectal (cream)	25 mg g^{-1}	$25 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$	$24 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$	1.00	1.22
Gastrodenol (Tablet)	70 mg g^{-1}	$66 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}$	$69 \pm 5 \text{ mg g}^{-1}$	6.25	0.96
Labcatal (Vial)	35 mg L^{-1}	$34.7 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$	$34.4 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$	4.00	1.16

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) through Project CTQ2013-47461-R co-financed by FEDER funds. J. Avivar acknowledges to the Torres Quevedo Program of the MINECO co-financed with European Funds for the financial support through the PTQ-2012-05755. C. Calderilla acknowledges to the National Council of Science and Technology in Mexico (CONACYT) for the allowance of a grant.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The authors acknowledge financial support from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) through Project CTQ2013-47461-R co-financed by FEDER funds. J. Avivar acknowledges to the Torres Quevedo Program of the MINECO co-financed with European Funds for the financial support through the PTQ-2012-05755. C. Calderilla acknowledges to the National Council of Science and Technology in Mexico (CONACYT) for the allowance of a grant.

References

- [1] M.A. Taher, M. Rahimi and H. Fazelirada, *J. Lum.* **145**, 976 (2014). DOI:10.1016/j.jlumin.2013.09.025.
- [2] N. Yang and H. Sun, *Bismuth: Environmental Pollution and Health Effects. Encyclopedia of Environmental Health* (Elsevier, Burlington, 2011), p. 414.
- [3] A.K. Das, R. Chakraborty, M.L. Cervera and M. De La Guardia, *Trends Anal. Chem.* **25**, 599 (2006). DOI:10.1016/j.trac.2006.01.006.
- [4] B.A. Fowler, D.W. Sullivan Jr and M.J. Sexton, *Volumen II Specific Metals, Handbook on the Toxicology of Metals* (Academic Press, Amsterdam, 2015), p. 656.
- [5] F. Cui, L. Wang and Y. Cui, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 1033 (2007). DOI:10.1016/j.jpba.2006.10.003.
- [6] C. Zeng, L. Ji, C. Zhou, F. Zhang, M. Liu and Q. Xie, *Microchem. J.* **119**, 1 (2015). DOI:10.1016/j.microc.2014.10.003.
- [7] M. Sun and Q. Wu, *J. Haz. Mat.* **192**, 935 (2011). DOI:10.1016/j.jhazmat.2010.11.044.
- [8] K. Norisuye and Y. Sohrin, *Anal. Chim. Acta.* **727**, 71 (2012). DOI:10.1016/j.aca.2012.03.042.
- [9] P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis and A. Economou, *Anal. Chim. Acta.* **505**, 167 (2004). DOI:10.1016/S0003-2670(03)00017-5.
- [10] P.C. Jerónimo, A.N. Araújo, M.B. Montenegro, D. Satinský and P. Solich, *Anal. Chim. Acta.* **504**, 235 (2004). DOI:10.1016/j.aca.2003.10.049.
- [11] A.S. Amin and I.A. Zaafarany, *J. Taibah Univ. Sci.* **9**, 490 (2015). DOI:10.1016/j.jtusci.2015.01.003.
- [12] G. Gumus, H. Filik and B. Demirata, *Anal. Chim. Acta.* **547**, 138 (2005). DOI:10.1016/j.aca.2005.03.028.
- [13] L.J. Gimbert and P.J. Worsfold, *Trends Anal. Chem.* **26**, 914 (2007). DOI:10.1007/s00216-009-2745-5.
- [14] F. Maya, J.M. Estela and V. Cerda, *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1577 (2009). DOI:10.1007/s00216-009-2745-5.
- [15] J. Avivar, L. Ferrer, M. Casas and V. Cerda, *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 871 (2010). DOI:10.1007/s00216-010-3600-4.

- [16] R.N. Páscoa, I.V. Tóth and A.O. Rangel, *Anal. Chim. Acta.* **73**, 1 (2012). DOI:10.1016/j.aca.2012.05.058.
- [17] A. González-Portal, F. Bermejo-Martínez, C. Baluja-Santos and M.C. Díez-Rodríguez, *Microchem. J.* **31**, 368 (1985). DOI:10.1016/0026-265X(85)90128-6.
- [18] J. Szpunar, *Anal. Chim. Acta.* **251**, 275 (1991). DOI:10.1016/0003-2670(91)87147-Y.
- [19] E. Sandell, *Colorimetric Determination of Traces of Metals* (Interscience Publishers, New York, 1959).
- [20] M. Sadaaki and Y. Takashi, *Polyhedron* **1**, 405 (1982). DOI:10.1016/S0277-5387(00)80828-1.
- [21] K. Cheng, *Anal. Chim. Acta.* **28**, 41 (1963). DOI:10.1016/S0003-2670(00)87194-9.
- [22] B. Karadakov, D. Kantcheva and P. Nenova, *Talanta* **15**, 525 (1968). DOI:10.1016/0039-9140(68)80126-2.
- [23] V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar and A. Cerdà, *Flow Analysis; A Practical Guide* (Elsevier Science, Amsterdam, 2014).
- [24] V. Cerdà, J. Avivar and A. Cerdà, *Pure Appl. Chem.* **84**, 1983 (2012). DOI:10.1351/PAC-CON-11-11-14.
- [25] D.G. Themelis, P.D. Tzanavaras and J.K. Papadimitriou, *Analyst.* **126**, 247 (2001). DOI:10.1039/b008661o.
- [26] V. Cerdà, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira and P. Sitjar, *Talanta* **50**, 695 (1999). DOI:10.1016/S0039-9140(99)00196-4.
- [27] R. Leardi, *Anal. Acta Chim.* **652**, 161 (2009). DOI:10.1016/j.aca.2009.06.015.
- [28] G. Derringer and R. Suich, *J. Quality Technol.* **12**, 214 (1980).
- [29] J. Hernández, B. Moreno, R. Carabias and L. Gutierrez, *Microchem. J.* **35**, 288 (1987). DOI:10.1016/0026-265X(87)90112-3.
- [30] G.L. Long and J. Winefordner, *Anal. Chem.* **55**, 712 (1983). DOI:10.1021/ac00259a060.
- [31] J.C. Miller and J.N. Miller. *Statistics for Analytical Chemistry* (Ellis Horwood, Englewood Cliffs, NJ, 1992).
- [32] S. Pozdniakovaa, A. Padaruskasa and G. Schwedt, *Anal. Chim. Acta.* **351**, 41 (1997). DOI:10.1016/S0003-2670(97)00331-0.



3D printed device including disk-based solid-phase extraction for the automated speciation of iron using the multisyringe flow injection analysis technique



Carlos Calderilla^{a,b}, Fernando Maya^{a,*}, Víctor Cerdà^a, Luz O. Leal^b

^a Laboratory of Environmental Analytical Chemistry—LQA², University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain

^b Environment and Energy Department, Advanced Materials Research Center, Miguel de Cervantes 120, 31136 Chihuahua, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

3D printing
Solid-phase extraction
Multisyringe flow injection analysis
Automation
Water analysis
Iron determination

ABSTRACT

The development of advanced manufacturing techniques is crucial for the design of novel analytical tools with unprecedented features. Advanced manufacturing, also known as 3D printing, has been explored for the first time to fabricate modular devices with integrated features for disk-based automated solid-phase extraction (SPE). A modular device integrating analyte oxidation, disk-based SPE and analyte complexation has been fabricated using stereolithographic 3D printing. The 3D printed device is directly connected to flow-based analytical instrumentation, replacing typical flow networks based on discrete elements. As proof of concept, the 3D printed device was implemented in a multisyringe flow injection analysis (MSFIA) system, and applied to the fully automated speciation, SPE and spectrophotometric quantification of Fe in water samples. The obtained limit of detection for total Fe determination was 7 ng, with a dynamic linear range from 22 ng to 2400 ng Fe (3 mL sample). An intra-day RSD of 4% (n = 12) and an inter-day RSD of 4.3% (n = 5, 3 mL sample, different day with a different disk), were obtained. Incorporation of integrated 3D printed devices with automated flow-based techniques showed improved sensitivity (85% increase on the measured peak height for the determination of total Fe) in comparison with analogous flow manifolds built from conventional tubing and connectors. Our work represents a step forward towards the improved reproducibility in the fabrication of manifolds for flow-based automated methods of analysis, which is especially relevant in the implementation of interlaboratory analysis.

1. Introduction

Additive manufacturing, also known as 3D printing, is becoming a key technology for the advancement of multiple scientific fields such as medicine [1], biology [2], chemistry [3,4], biochemistry [5] and nanotechnology [6]. In the analytical chemistry field, the precise layer-by-layer material deposition enabled by 3D printing has been explored for the design of unprecedented flow-based and low cost devices for the automation of different methodologies [7–9]. Exploiting 3D printing, micro/mesofluidic devices with complex geometries are fabricated with high reproducibility, decreasing time and costs [10,11]. Nowadays, different 3D printing techniques have been developed based on stereolithography (SLA), fused deposition modeling (FDM), selective laser sintering (SLS), and PolyJet Technology, among others [2,12].

3D printing has been explored to fabricate flow-based devices [13–19], novel conducting electrode architectures [20], SPE devices [3,21],

devices for micro free-flow electrophoresis [22], supports for planar chromatography [9,23], flow-cells for chemiluminescence detection [24], or injection valves for a flow system coupled to ICP-MS [25]. The facile, fast and low-cost fabrication of complex fluidic architectures using 3D printing makes this manufacturing technique highly desirable for the development of novel devices for sample preparation [26–28]. The combination of flow-based automated techniques and 3D printing opens new avenues for the integration and miniaturization of analytical methods, increasing reproducibility and analysis throughput and decreasing reagent consumption [3,29].

Solid-phase extraction (SPE) is a popular sample preparation technique due to its well-known advantages, including high preconcentration efficiencies, high reproducibility, low or negligible organic solvent consumption, and the facile automation of the extraction process [30]. However, SPE often involves additional sample preparation steps, such as analyte oxidation, or analyte derivatization/complexation. On the one hand, the flow-based automation of additional

* Corresponding author.

E-mail address: fernando.maya@uib.es (F. Maya).

pre- or post-SPE steps increases the complexity of the required flow network, with detriment to the reproducibility of the method. On the other hand, the design of 3D printed devices encompassing an SPE unit integrating all required elements to build the flow network could be easily shared and printed between labs, facilitating interlaboratory comparisons (STL files of the printed devices in this work are shared in the [Supporting information](#)).

A robust and versatile technique for SPE automation is the Multisyringe Flow Injection Analysis (MSFIA) technique [31,32]. MSFIA has been implemented for the automation of SPE using packed beds [33], magnetic particles [34], sorptive stir bars [35] and disks [36–41], and applied to the preconcentration of metals [24,26–28,30], organic compounds [42], and radioactive isotopes [43].

Due to the importance in the control of Fe concentration in the human metabolism and its applicability in the study for the control of other metals through their mobility, toxicity and bioavailability, the determination of Fe in environmental and food samples requires the development of sensitive, rapid and efficient analytical methodologies [44]. Usually, the total Fe concentration ranges from 0.5 mg L^{-1} to 10 mg L^{-1} for groundwater samples. Total Fe concentrations in drinking waters are typically below 0.3 mg L^{-1} . In the case of river waters the average value for total Fe concentration is 0.7 mg L^{-1} [45]. The concentrations of the Fe species present in the water samples will depend on their origin, i.e. for Fe(II) it occurs under reducing conditions found in some groundwater and soils (concentrations less than 1 mg L^{-1}), while Fe(III) predominates in more oxygenated conditions like most surface waters (concentrations lower than 2 mg L^{-1}) [46].

Recently, Mattio et al. [47] described a 3D printed multipumping flow system including a SPE unit for the determination of lead. They reported an interesting modular design enabling the packing of a Pb selective resin for SPE. Besides functional beads, SPE disks are an interesting alternative to bead packings, enabling high reproducibility and low backpressure in flow-based systems [48].

In this work, the first 3D printed device for disk-based SPE has been developed by using SLA 3D printing to build a two-piece modular device. SLA enabled the fabrication of devices with intricate geometries integrating the required features for pre-SPE (part 1) and post-SPE (part 2) sample treatment steps, enabling the fully automated analyte determination using the MSFIA technique. The two modules of the SPE device are assembled accommodating a sorbent disk between them. As proof of concept application, the fully-automated speciation and determination of iron in water samples was evaluated. To the authors' knowledge, this is the first example of application of 3D printed devices for automated SPE including pre-SPE and post-SPE integrated sample preparation.

2. Experimental section

2.1. Reagents

All solutions were prepared from analytical grade reagents and Millipore quality water. Fe standards were prepared from a stock solution of $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ Fe(II), or Fe(III), by stepwise dilution of the stock solution with buffer solution (pH = 2.5). Stock solutions (1 L) were prepared from ammonium iron(III) sulfate dodecahydrate, or ammonium iron(II) sulfate hexahydrate (Scharlau, Spain) containing 10 mL of hydrochloric acid 37% and 5.5 mL of sulfuric acid 96% (Scharlau), respectively. A 0.1 mol L^{-1} formic acid (95%, Sigma Aldrich, Germany) solution was used as buffer solution for standard solutions and samples.

Other reagents used for the determination of Fe were hydrogen peroxide, sodium chloride and ammonium thiocyanate (Scharlau). To study the effect of potential interferences, sodium carbonate anhydrous (Scharlau), sodium sulfate anhydrous (Scharlau), sodium chloride (Scharlau), sodium nitrate (Riedel de Haën, Germany) and standard

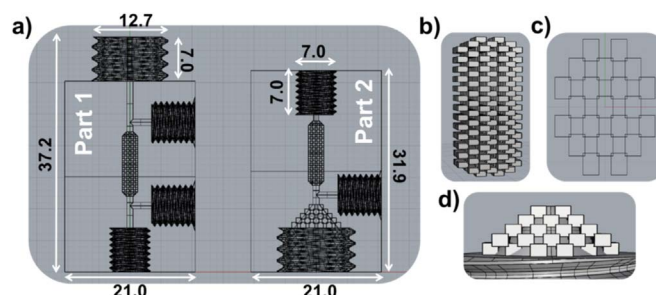


Fig. 1. Representation of the 3D printed device for SPE. a) Parts of the extraction device, dimensions in mm. b) Detail of the mixers present in both parts of the device. c) Detail of a layer of cubes of a mixer. d) Design of the sorbent disk support present in Part 2 based on a truncated cone made of cubes.

solutions of 1000 mg L^{-1} of Co(II), Cu(II), Pb(II), Ni(II), Mn(II), Cr(III), Al(III) and Cd(II) (Scharlau), were used. Isopropyl alcohol (Scharlau) was employed to rinse unreacted monomers from 3D printed devices.

2.2. 3D printed SPE device

To demonstrate the potential of low cost SLA 3D printing to build integrated SPE devices, we proposed a two-part design shaping a device for the analyte speciation, SPE and complexation (Fig. 1). Part 1 integrates a confluence point and a mixer for analyte oxidation prior to SPE, and includes a second confluence point for analyte elution. Part 2 contains a support for the sorbent disk, a confluence point for the addition of a complexing reagent, and a mixer for the development of the reaction product. Mixers are based on networks of small cubes shaping interconnected networks. The disk support is also based on a network of interconnected cubes printed inside a truncated cone.

Device fabrication was carried out using a Form+1 3D Printer (Formlabs Inc., Somerville, USA). Clear Photoactive resin (Formlabs) was used. Resin is composed by methacrylated monomers and oligomers, and an initiator.

The dimensions of the parts of the SPE device for the speciation and determination of Fe are shown in Fig. 1. Part 1 of the device is composed by a sample inlet and a confluence point to mix the sample with an oxidant enabling analyte speciation. After the confluence point, a mixer is printed to ensure a high yield of the oxidation process. A second confluence point is printed after the mixer, in order to inject the eluent into the device once SPE has been accomplished. Part 2 contains the conical support to place the sorbent disk. This part also integrates a confluence point for analyte mixing with a complexing reagent and, a mixer for the development of the reaction product. Both parts are shown in Fig. 1a. Fig. 1b and c, show the matrix of cubes (mixers) used in both parts of the device. Fig. 1d shows in detail the geometry of the sorbent disk support.

Mixers are composed by a matrix of cubes with the following dimensions: $12.2 \text{ mm length} \times 2.1 \text{ mm width}$. The size of each cube is 0.4 mm . The separation between cubes is 0.3 mm . Cubes are superposed by an area of 0.05 mm . The disk support is also based on a matrix of interconnected cubes with the following dimensions: truncated cone $1 \text{ mm} \times 7 \text{ mm} \times 3.7 \text{ mm}$ (smaller diameter \times larger diameter \times height) with cubes of $0.9 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$ (side, separation and superposition). The dimensions of the threads $7 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$ (diameter \times length) and the external dimensions are: first piece $30.2 \text{ mm} + 7 \text{ mm} \times 12.69 \text{ mm} \times 21 \text{ mm}$ (length + length of thread \times diameter of thread \times width) and the second piece $31.9 \text{ mm} \times 21 \text{ mm}$ (length \times width). The internal diameter of the flow channels of the device is 1 mm .

The 3D printed device was designed using Rhinoceros 5 SR11 32 software (McNeel & Associates, USA) and printed by Preform software (Formlabs). The designs of the 3D printed are available in the

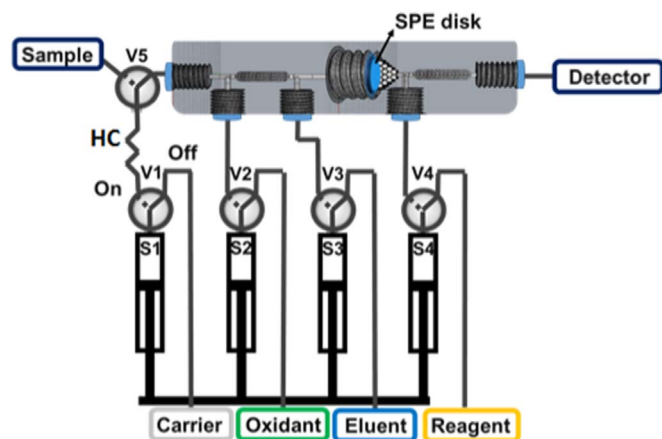


Fig. 2. MSFIA set up for the speciation and determination of Fe using a 3D printed SPE device containing a sorbent disk. V1-V5: Three-way solenoid valves; S1-S4: Syringes; HC: Holding coil.

Supporting information. Unreacted monomers filling the channels of the 3D printed device are rinsed by pumping isopropyl alcohol using a HPLC pump (Waters, Milford, USA). The 3D printed parts are dried at room temperature for 15 min and placed in a CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP, Upland, Canada) between 8 and 10 h using a lamp with a wavelength of 365 nm.

Printing time (1 piece: 120 min; 2 pieces: 156 min; 4 pieces: 204 min, with 0.05 resolution, 744 layers, vertical printing without stand). The weight of the device is 24 g and the cost regarding the consumed ink is approximately US\$3.75.

2.3. Manifold and instruments

The 3D printed SPE device was implemented in a MSFIA system with spectrophotometric detection (Fig. 2). The proposed set-up is based on a multisyringe burette with a 5000 step motor (BU 4S, Crison, Spain), to simultaneously pump up to four syringes, each one equipped with a three-way solenoid valve (V1-V4) (N-Research, Caldwell, NJ, USA). Glass syringes of 10 mL (S1), 5 mL (S2-S3) and 2.5 mL (S4) (Hamilton, Switzerland) were used. An additional three-way solenoid valve (V5) (Takasago Electric Inc., Japan) was used for sample loading. The connections from the multisyringe pump to the 3D printed device were made of 0.8 mm i.d. polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing. A holding coil (HC) with a volume of 10 mL made of PTFE 1.5 mm i.d. was connected between V5 and S1 and used for sample loading.

The detection system is based on a portable CCD spectrophotometric detector USB 2000 (Ocean Optics, USA), a bright-white LED light source, and a flow cell (Starna, Hainault, UK) with an optical path of 10 mm. The analytical signal was recorded at 480 nm using a correction wavelength at 700 nm. The software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems, Bunyola, Spain) was used for instrument control, data acquisition and processing.

Method validation was performed using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES, Optima 5300DV, Perkin Elmer). Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectra were recorded using a Bruker Tensor 27 FT-IR instrument working at 3 cm^{-1} resolution.

2.4. Analytical procedure

The operational sequence for the determination of total Fe is described in Table 1 and summarized as it follows: sample is loaded into a holding coil placed between V1 and V5 in position “On”. The sample is pumped towards the 3D printed device where is mixed with hydrogen peroxide to oxidize Fe(II) to Fe(III) (S2), this reaction is carried out in the first mixer of the device, and the oxidation product is

pumped through the sorbent disk (V1-V2 “On”) for the preconcentration of the analyte.

In the next step, the spectrophotometric detector starts data acquisition, then a hydrochloric acid solution (S3) is passed through the sorbent disk to elute the analyte. The eluted analytes is mixed with the complexing reagent ammonium thiocyanate (S4) and dispensed towards the detector (V3-V4 “On”). The SPE disk is washed using the NaCl solution as carrier (S1). For the determination of Fe(III) same procedure is executed, with S2 in “Off” position in the step number 2.

3. Results and discussion

3.1. Configurations of the 3D printed device

For the initial tests, experimental conditions proposed by Pons et al. [36], were used for determination of total Fe. Chelating disks (3M Empore) were used as SPE sorbent. A small disk portion (10 mm diameter) was placed in the 3D printed device. A 2 mol L^{-1} NaCl solution was used as carrier (S1). The pH of the sample/standard solutions was adjusted to 2.5 using 1 mol L^{-1} formic acid. A 0.025 mol L^{-1} H_2O_2 solution ensured the total oxidation of Fe(II) to Fe(III), since identical slopes of the calibration curves were obtained for both Fe(III) and total Fe determination. Solutions containing same amount of Fe(II) and Fe(III) were used for total Fe determination.

Four different configurations of the 3D printed device were tested. A basic disk holder (DH) with no integrated features was 3D printed for comparison purposes. The basic holder is identical to the micromachined disk holder used in previous work [36]. The first configuration (C1) contains integrated confluence points for oxidant, eluent and complexing reagent, but no integrated cube-matrix mixers for enhanced mixing. The second configuration (C2) contains an integrated mixer in Part 2 to enhance the post-SPE colorimetric reaction. The third configuration (C3) contains a cubic-matrix mixer in Part 1 to enhance sample mixing with the oxidant solution. The fourth configuration (C4) contains integrated mixers in both parts of the device.

The experiments for Fe(III) determination were performed using 3 mL of a $200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Fe(III) standard solution. For total Fe determination, 3 mL of a $200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Fe standard solution ($100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Fe(III) + $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Fe(II)) were used. The results for the determination of Fe(III) and total Fe using the different configurations are shown in Fig. 3a. The results obtained using the developed 3D printed devices were compared with an analogous flow system made from discrete elements. The typical flow-based configuration is based on a T-connector to mix sample and oxidant followed of a reaction coil (length 27 cm ; 0.8 mm i.d.). Another T-connector for eluent addition is placed between the oxidation coil and the SPE disk holder (DH). Between the SPE unit and the detector, a third T-connector is placed for the addition of the complexing reagent followed by a reaction coil (length 27 cm ; 0.8 mm i.d.) to facilitate the development of the reaction product. As is shown in Fig. 3a, the integration of the confluence points into the 3D printed device (C1) showed an improvement on the peak height of the measured signal in comparison with the flow-system composed by discrete elements (DH). Analyte signal peak height gradually improved by incorporating the two mixers based on interconnected cube matrices. A clear trend on the improvement of sensitivity was observed by gradually increasing the number of elements integrated in the 3D printed device.

3.2. Composition of the 3D printed device

The resin used to print the devices tested in this work is composed by methacrylated monomers and oligomers. As a test experiment, we studied the effect of the polymeric material of the 3D printed device on the extraction of the Fe. Due to the functional groups of the commercial resin for SLA 3D printing (FT-IR and band assignment is shown in Fig. S1), the potential ability to act as a weak cation exchanger under the

Table 1
Summarized analytical procedure for the speciation and determination of Fe by the developed method.

Step	Instruction	Pump	Valve position					Volume (mL)	Flow rate (mL min ⁻¹)
			V1	V2	V3	V4	V5		
1	Sample loading	Pick up	On	Off	Off	Off	On	3	3
2	Oxidation and SPE	Dispense	On	On	Off	Off	Off	4	2
3	Detection. Start data acquisition	—							
4	Elution and analyte signal acquisition	Dispense	Off	Off	On	On	Off	1.5	2
5	Injection of carrier. Rinsing 3D printed device and detector	Dispense	On	Off	Off	Off	Off	1	2
6	Stop signal acquisition. End analysis. Return at step 1 if required.								

established experimental conditions should be studied [49]. In order to quantify this effect, we executed the developed method for the determination of total Fe using the C4 3D printed device in the absence of a chelating disk. In this case, no detectable analytical signals were measured after performing three different replicates of the analysis using a concentration of 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ of total Fe. Therefore, the retention of the Fe(III) on the 3D printed polymeric material was negligible.

3.3. Speciation and preconcentration of Fe

Extraction and elution flow rates, eluent and complexing reagent concentration, and eluent volume were studied to select the best conditions for the determination of Fe using the developed 3D printed device (C4 configuration). A volume of 3 mL of a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ total Fe standard (100 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each cation) was used for these experiments. The results of this stage are showed in Fig. 3.

The effect of the extraction and elution flow rates was evaluated in

the range from 1 to 2.6 mL min⁻¹. A flow rate of 1 mL min⁻¹ is the minimum flow rate enabled by the multisyringe pump using a 10 mL syringe. A flow rate of 2.6 mL min⁻¹ is the maximum flow rate which did not produced any apparent backpressure into the flow system. For the preconcentration flow rate, the signal decreased as the flow rate increased due to the decrease of the analyte mass transfer from the standard solution to the sorbent disk (Fig. 3b). A sample flow rate of 2 mL min⁻¹ was selected for further studies in a compromise between a high sensitivity and precision, as well as a high analysis throughput. The optimization of the eluent flow rate is critical to ensure the proper analyte desorption and the subsequent development of the colorimetric reaction for analyte quantification. The effect of the eluent flow rate remained constant in the range from 1 mL min⁻¹ to 2 mL min⁻¹ (Fig. 3b). A signal decrease was observed using higher flow rates, selecting a flow rate of 2 mL min⁻¹ for further studies.

In the study of the eluent concentration, the highest absorbance signal was measured using a 2 mol L⁻¹ of HCl solution (Fig. 3c). As also

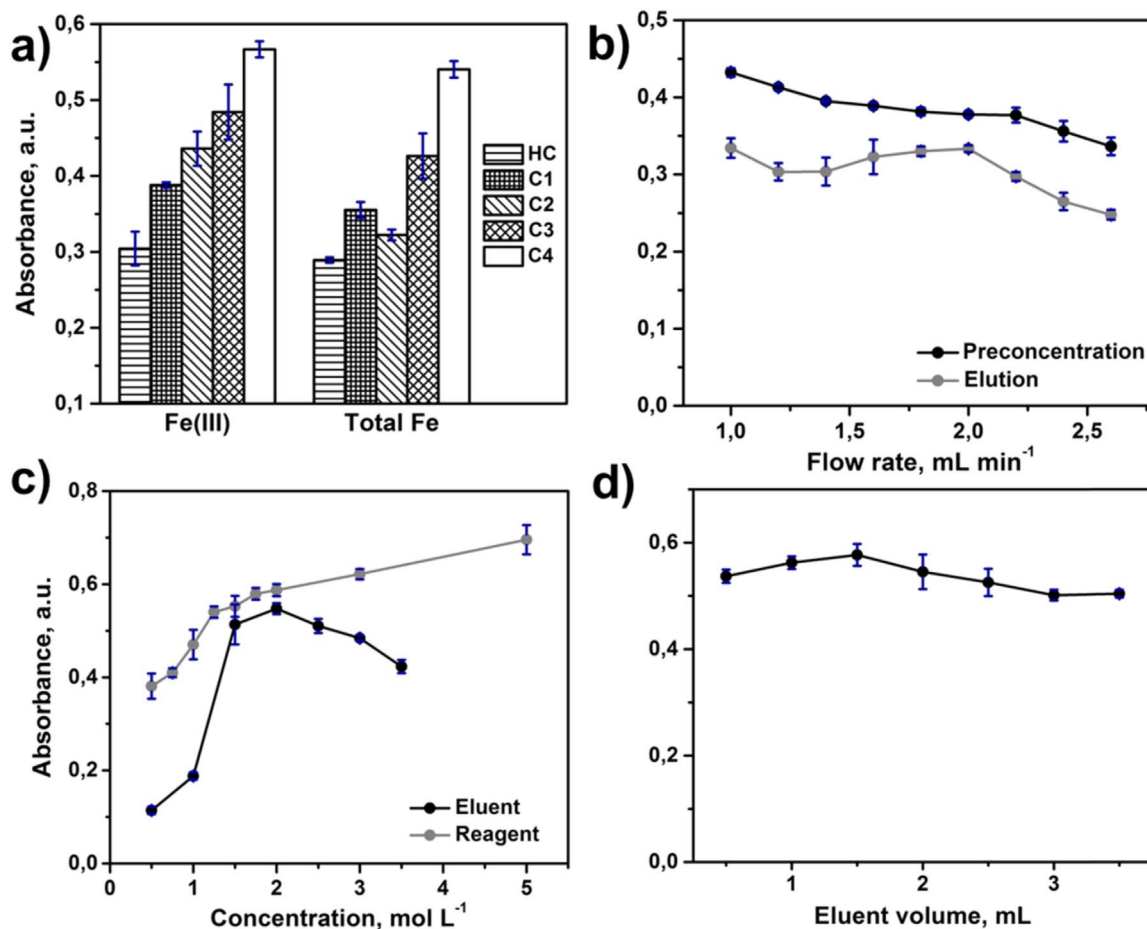


Fig. 3. Study of the parameters involved in the determination of total Fe using the developed 3D printed SPE device: a) comparison between different configurations of the 3D printed device, b) optimization of preconcentration and elution flow rates, c) optimization of eluent and chromogenic reagent concentration, and d) optimization of eluent volume.

Table 2
Analytical parameters for speciation and determination of Fe by proposed method.

Analytical parameters	Fe(III)	Total Fe
Detection limit (ng)	7	7
Quantification limit (ng)	21	22
Linear working range (ng)	21–2400	22–2400
Sensitivity (UA/ng)	0.0009	0.0008
Intra-day RSD (% , n = 12)	3.8 [*] /2.8 ^{**}	4 [*] /2.4 ^{**}
Inter-day RSD (% , n = 5)	3.6 ^{**}	4.3 ^{**}
Analysis throughput (h ⁻¹)	15	
Disk durability (injections)	100	

^{*} Lower level (50 µg L⁻¹).

^{**} Higher level (200 µg L⁻¹).

shown in Fig. 3c, an increase in the complexing reagent concentration had a positive effect on the analyte signal peak height. This variable was evaluated in the range from 0.5 to 5 mol L⁻¹ of NH₄SCN, selecting a concentration of 1.25 mol L⁻¹. The NH₄SCN concentration was selected with the criteria to obtain good signal to blank ratio, low standard deviation values obtained, and simultaneously using the minimum amount of NH₄SCN possible, in order to minimize reagent consumption.

The study of the eluent volume was carried out in the range from 0.5 to 3.5 mL (Fig. 3d). An eluent volume of 0.5 mL was sufficient to ensure the quantitative desorption of the analytes from the SPE disk. Analyte peak height increased up to a volume of eluent of 1.5 mL, selecting this value for further experiments.

3.4. Analytical features

Analytical parameters were established under the selected experimental conditions for the determination of Fe(III) and total Fe (Table 2). The calibration curves obtained for the determination of Fe(III) and total Fe were $[y = 0.0009 (\text{ng Fe}^{3+}) - 0.028, R^2 = 0.999, n = 9]$ and $[y = 0.0008 (\text{ng Fe}) + 0.007, R^2 = 0.999, n = 9]$, respectively. Mass calibration showed a linear preconcentration up to a volume of 24 mL at a concentration level of 200 µg L⁻¹ total Fe.

The linear working range was established from 22 ng to 2400 ng of total Fe. The limit of detection for total Fe was 7 ng. The obtained LODs are at least one order of magnitude lower than those obtained with other automated SPE methods using chelating disks and typical tube-based flow systems [37,38]. The intra-day precision was evaluated as the relative standard deviation (RSD) at two different levels of concentration (50 µg L⁻¹ and 200 µg L⁻¹) for 12 consecutive injections. The inter-day precision was calculated from signals obtained using 5 different disks at 5 different days (n = 5). In the Fe(III) determination, the intra-day precision was 3.8% (50 µg L⁻¹) and 2.8% (200 µg L⁻¹). For the determination of total Fe, these values were 4.0% (50 µg L⁻¹) and 2.4% (50 µg L⁻¹). The inter-day precision was 3.6% for Fe(III) and 4.3% for total Fe. The precision of the MSFIA combined with the 3D printed device is similar to those obtained by previous work [36–38]. The analysis throughput for a sample volume of 3 mL was 15 h⁻¹. The average lifetime of the chelating disk was studied for the preconcentration of total Fe (3 mL, 200 µg L⁻¹), and 100 consecutive injections were carried out with recoveries above 95% (Fig. 4).

3.5. Interferences

The effect of the presence of other ions on the determination of Fe was evaluated. The tolerance ratios were established as the concentration of the added species, which causes a signal variation ≥ 10% (sample volume, 3 mL. Total Fe concentration, 200 µg L⁻¹). The study of potential interferences includes the typical ions present in water samples, which may be retained on the chelating disk (Pb²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Al³⁺, Cr³⁺). In the case of Cu²⁺, a positive

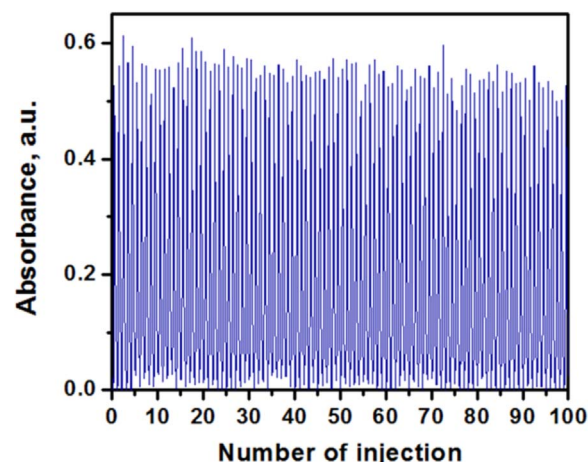


Fig. 4. Durability of the chelating disk for 100 consecutive total Fe determinations. Sample volume, 3 mL. Total Fe concentration, 200 µg L⁻¹.

interference was observed with a 10:1 tolerance respect to the analyte concentration. The tolerated level of the Pb²⁺, Cd²⁺, Co²⁺ and Al³⁺ was 100:1. The ions Mn²⁺, Ni²⁺ and Cr³⁺ showed no significant interference even at the 1000:1 level.

Sulfate, nitrate, chloride and carbonate are the most common anions present in water samples. However, none of these anions showed a significant interference at a 5000:1 level.

3.6. Analysis of a certified reference material

Two certified reference materials were tested for the validation of the proposed method. The results of the analysis of a certified reference river water SLRS-4 (Institute for National Measurement Standard), and a certified reference wastewater material SPS-WW2 batch 106 (National Institute of Standard and Technology), were evaluated at pH 2.5 (Table 3). The certified value for total Fe in the river and wastewater samples were 103 ± 5 µg L⁻¹ and 5000 ± 25 µg L⁻¹, respectively. Three replicates of the samples (sample volume, 3 mL) were performed. The measured total Fe was 105.1 ± 6 µg L⁻¹ and 5210 ± 129 µg L⁻¹. The *t*-test for comparison of means showed no significant differences at the 95% confidence level between the values obtained with the proposed method and the certified values.

3.7. Comparison with ICP-OES

In this study, two groundwater samples and two landfill leachates were analyzed. Groundwater samples were collected from two different locations in Mallorca, Spain. These samples were analyzed after adjusting the sample medium to pH = 2.5. The leachates were obtained from a solid waste treatment plant from Mallorca, Spain. These samples were filtered (Nylon filter, 0.45 µm) and sample medium was adjusted to pH = 2.5. The different samples were analyzed with the proposed method and by ICP-OES performing three replicates. As is shown in Table 3, no significant differences at the 95% confidence level were obtained between the values measured with both techniques.

3.8. Spiked samples

The speciation of Fe was evaluated through the addition of different amounts of Fe(II) and Fe(III) to the groundwater 1 sample. The results were evaluated with recoveries of Fe total and Fe(III). Each sample was analyzed directly and after spiking with different concentrations of Fe(II) and Fe(III). In all cases, satisfactory recoveries for total Fe and Fe(III) ranking from 95% to 103% (Table 4) were obtained.

Table 3

Validation and application of the proposed method to water samples.

Sample	Certified value	Proposed method	Sample	ICP-OES	Proposed method
River water	103 ± 5	105 ± 6	Groundwater 1	35 ± 1	38 ± 2
Wastewater	5000 ± 25	5210 ± 129	Groundwater 2	354 ± 7	361 ± 8
			Leachate 1	133 ± 1	132 ± 10
			Leachate 2	527 ± 4	516 ± 22

Fe concentration in $\mu\text{g L}^{-1}$

Results are expressed as mean of three determinations ± Standard deviation.

Table 4

Spiking studies for groundwater 1 sample by the proposed method.

Fe conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Added ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recovery (%)	
	Fe(II)	Fe(III)	Total Fe	Fe(III)	Total Fe	Fe(III)
38 ± 2	0	200	245 ± 3	242 ± 2	103	102
38 ± 2	200	0	228 ± 9	37 ± 6	96	97
38 ± 2	100	100	232 ± 3	137 ± 8	97	99
38 ± 2	150	50	229 ± 9	90 ± 5	96	102
38 ± 2	50	150	233 ± 9	187 ± 9	97	99

Results are expressed as mean of three determinations ± Standard deviation.

4. Conclusion

In summary, a modular 3D printed device with integrated features has been fabricated using SLA. Analyte oxidation, SPE, and complexation were carried out in a single device. The implementation of the 3D printed device in a MSFIA manifold enabled the fully automated speciation, preconcentration and determination of Fe. The 3D printed device replaced typical elements of flow networks, made of tubing and discrete elements, showing improved performance. The developed 3D printed device is highly robust, and suitable for application to real samples, as showed for the Fe determination on certified reference materials, and comparison with ICP-OES.

Integrated 3D printed devices are a step forward towards the full reproducibility of complex flow-based networks for automated chemical analysis. Novel designs for 3D printed devices for integrated sample preparation can be simply designed and printed, or shared between different laboratories. In addition, the development of novel materials for 3D printing could lead to a dramatic increase of the applicability of 3D printed devices in the analytical field.

Acknowledgements

The Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and the European Funds for Regional Development (FEADER) are gratefully acknowledged for financial support through Project CTQ2016-77155-R. C.C. acknowledges to the National Council of Science and Technology in Mexico (CONACYT) for the allowance of a grant. E. Palacio is acknowledged for the provision of water samples.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.028>.

References

- Biggs, A. Pandit, D.I. Zeugolis, 2D imprinted substrates and 3D electrospun scaffolds revolutionize biomedicine, *Nanomedicine* 11 (2016) 989–992.
- S. Tsuda, H. Jaffery, D. Doran, M. Hezwani, P.J. Robbins, M. Yoshida, L. Cronin, Customizable 3D printed “plug and play” millifluidic devices for programmable fluidics, *PLoS One* 10 (2015) e0141640.
- C.-K. Su, P.-J. Peng, Y.-C. Sun, Fully 3D-printed preconcentrator for selective extraction of trace elements in seawater, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6945–6950.
- J. Prikrýl, F. Foret, Fluorescence detector for capillary separations fabricated by 3D printing, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11951–11956.
- M. Vaezi, H. Seitz, S. Yang, A review on 3D micro-additive manufacturing technologies, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 67 (2013) 1721–1754.
- V.F. Paz, M. Emons, K. Obata, A. Ovsianikov, S. Peterhänsel, K. Frenner, C. Reinhardt, B. Chichkov, U. Morgner, W. Osten, Development of functional sub-100 nm structures with 3D two-photon polymerization technique and optical methods for characterization, *J. Laser Appl.* 24 (2012) 42004.
- M.D. Symes, P.J. Kitson, J. Yan, C.J. Richmond, G.J.T. Cooper, R.W. Bowman, T. Vilbrandt, L. Cronin, Integrated 3D-printed reactionware for chemical synthesis and analysis, *Nat. Chem.* 4 (2012) 349–354.
- B.C. Gross, J.L. Erkal, S.Y. Lockwood, C. Chen, D.M. Spence, Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3240–3253.
- N.P. Macdonald, S.A. Currivan, L. Tedone, B. Paull, Direct production of micro-structured surfaces for planar chromatography using 3D printing, *Anal. Chem.* 89 (2017) 2457–2463.
- S. Waheed, J.M. Cabot, N.P. Macdonald, T. Lewis, R.M. Guijt, B. Paull, M.C. Breadmore, 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers, *Lab Chip* 16 (2016) 1993–2013.
- B.C. Gross, S.Y. Lockwood, D.M. Spence, Recent advances in analytical chemistry by 3D printing, *Anal. Chem.* (2016).
- R. Amin, S. Knowlton, A. Hart, B. Yenilmez, F. Ghaderinezhad, S. Katebifar, M. Messina, A. Khademhosseini, S. Tasoglu, 3D-printed microfluidic devices, *Biofabrication* 8 (2016) 22001.
- A.I. Shallan, P. Smejkal, M. Corban, R.M. Guijt, M.C. Breadmore, Cost-effective three-dimensional printing of visibly transparent microchips within minutes, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3124–3130. <http://dx.doi.org/10.1021/ac4041857>.
- R.M. Frizzarin, E. Aguado, L.A. Portugal, D. Moreno, J.M. Estela, F.R.P. Rocha, V. Cerdà, A portable multi-syringe flow system for spectrofluorimetric determination of iodide in seawater, *Talanta* 144 (2015) 1155–1162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.069>.
- C.-K. Su, S.-C. Yen, T.-W. Li, Y.-C. Sun, Enzyme-immobilized 3D-printed reactors for online monitoring of rat brain extracellular glucose and lactate, *Anal. Chem.* 88 (2016) 6265–6273. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00272>.
- N.P. Macdonald, J.M. Cabot, P. Smejkal, R.M. Guijt, B. Paull, M.C. Breadmore, Comparing microfluidic performance of three-dimensional (3D) printing platforms, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3858–3866. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00136>.
- É.M. Kataoka, R.C. Murer, J.M. Santos, R.M. Carvalho, M.N. Eberlin, F. Augusto, R.J. Poppi, A.L. Gobbi, L.W. Hantao, Simple, expendable, 3D-printed microfluidic systems for sample preparation of petroleum, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3460–3467. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04413>.
- C. Chen, Y. Wang, S.Y. Lockwood, D.M. Spence, 3D-printed fluidic devices enable quantitative evaluation of blood components in modified storage solutions for use in transfusion medicine, *Analyst* 139 (2014) 3219–3226.
- K.B. Anderson, S.Y. Lockwood, R.S. Martin, D.M. Spence, A 3D printed fluidic device that enables integrated features, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5622–5626.
- A. Ambrosi, M. Pumera, 3D-printing technologies for electrochemical applications, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 2740–2755.
- R.M. Frizzarin, C. Palomino Cabello, M.D.M. Bauzá, L.A. Portugal, F. Maya, V. Cerdà, J.M. Estela, G. Turnes Palomino, Submicrometric magnetic nanoporous carbons derived from metal-organic frameworks enabling automated electromagnet-assisted online solid-phase extraction, *Anal. Chem.* 88 (2016) 6990–6995. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02065>.
- S.K. Anciaux, M. Geiger, M.T. Bowser, 3D printed micro free-flow electrophoresis device, *Anal. Chem.* 88 (2016) 7675–7682. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01573>.
- D. Fichou, G.E. Morlock, Open-source-based 3D printing of thin silica gel layers in planar chromatography, *Anal. Chem.* 89 (2017) 2116–2122. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04813>.
- K.B. Spilstead, J.J. Learey, E.H. Doeven, G.J. Barbante, S. Mohr, N.W. Barnett, J.M. Terry, R.M. Hall, P.S. Francis, 3D-printed and CNC milled flow-cells for chemiluminescence detection, *Talanta* 126 (2014) 110–115.
- C.-K. Su, S.-C. Hsia, Y.-C. Sun, Three-dimensional printed sample load/inject valves enabling online monitoring of extracellular calcium and zinc ions in living rat brains, *Anal. Chim. Acta* 838 (2014) 58–63.
- V. Camel, Solid phase extraction of trace elements, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 58 (2003) 1177–1233.
- A. Spietelun, L. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry, *J. Chromatogr. A* 1321 (2013) 1–13.

- [28] É.A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 224–235.
- [29] A.K. Au, N. Bhattacharjee, L.F. Horowitz, T.C. Chang, A. Folch, 3D-printed microfluidic automation, *Lab Chip* 15 (2015) 1934–1941.
- [30] F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollon, S.C.G.N. Braga, New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 14–23.
- [31] B. Horstkotte, O. Elsholz, V. Cerdà, Review on automation using multisyringe flow injection analysis, *J. Flow Inj. Anal.* 22 (2005) 99.
- [32] V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerda, *Flow Analysis: A Practical Guide*, Newnes, 2014.
- [33] B. Beltrán, J. Avivar, M. Mola, L. Ferrer, V. Cerda, L.O. Leal, Automated method for simultaneous lead and strontium isotopic analysis applied to rainwater samples and airborne particulate filters (PM10), *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 9850–9857.
- [34] F. Maya, C. Palomino Cabello, J.M. Estela, V. Cerda, G. Turnes Palomino, Automatic in-syringe dispersive microsolid phase extraction using magnetic metal-organic frameworks, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7545–7549.
- [35] M. Ghani, M. Saraji, F. Maya, V. Cerda, Automated multisyringe stir bar sorptive extraction using robust montmorillonite/epoxy-coated stir bars, *J. Chromatogr. A* 1445 (2016) 10–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.081>.
- [36] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, Expert multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron using chelating disks in water samples, *Anal. Chim. Acta* (2004) 79–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.011>.
- [37] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, Multi-pumping flow system for the determination, solid-phase extraction and speciation analysis of iron, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 33–39.
- [38] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples, *Talanta* 66 (2005) 210–217.
- [39] W.L. Castilleja-Rivera, L. Hinojosa-Reyes, J.L. Guzmán-Mar, A. Hernández-Ramírez, E. Ruíz-Ruiz, V. Cerdà, Sensitive determination of chromium (VI) in paint samples using a membrane optode coupled to a multisyringe flow injection system, *Talanta* 99 (2012) 730–736.
- [40] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Completely automated system for determining halogenated organic compounds by multisyringe flow injection analysis, *Anal. Chem.* 80 (2008) 5799–5805. <http://dx.doi.org/10.1021/ac8004633>.
- [41] W.L. Castilleja-Rivera, L. Hinojosa-Reyes, J.L. Guzmán-Mar, A. Hernández-Ramírez, E. Ruíz-Ruiz, V. Cerdà, Sensitive determination of chromium (VI) in paint samples using a membrane optode coupled to a multisyringe flow injection system, *Talanta* 99 (2012) 730–736.
- [42] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Flow analysis techniques as effective tools for the improved environmental analysis of organic compounds expressed as total indices, *Talanta* 81 (2010) 1–8.
- [43] R. Rodríguez, J. Avivar, L.O. Leal, V. Cerdà, L. Ferrer, Strategies for automating solid-phase extraction and liquid-liquid extraction in radiochemical analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 76 (2016) 145–152.
- [44] Y. Li, G. Peng, Q. He, H. Zhu, S.M.Z.F. Al-Hamadani, Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop followed by ICP-MS for the simultaneous determination of heavy metals in wastewaters, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 140 (2015) 156–161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.12.091>.
- [45] S.A.A. Elsuccary, A.A. Salem, Novel flow injection analysis methods for the determination of total iron in blood serum and water, *Talanta* 131 (2015) 108–115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.068>.
- [46] C. Neal, S. Lofts, C.D. Evans, B. Reynolds, E. Tipping, M. Neal, Increasing Iron concentrations in UK upland waters, *Aquat. Geochem.* 14 (2008) 263–288. <http://dx.doi.org/10.1007/s10498-008-9036-1>.
- [47] E. Mattio, F. Robert-Peillard, C. Branger, K. Puzio, A. Margaillan, C. Brach-Papa, J. Knoery, J.-L. Boudenne, B. Coulomb, 3D-printed flow system for determination of lead in natural waters, *Talanta* 168 (2017) 298–302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.059>.
- [48] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Interfacing on-line solid phase extraction with monolithic column multisyringe chromatography and chemiluminescence detection: an effective tool for fast, sensitive and selective determination of thiazide diuretics, *Talanta* 80 (2010) 1333–1340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.033>.
- [49] V. Neagu, I. Bunia, Acrylic weak base anion exchangers and their chemical stability in aggressive media, *Polym. Degrad. Stab.* 83 (2004) 133–138. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00234-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00234-9).



3D printed device for the automated preconcentration and determination of chromium (VI)

Carlos Calderilla^{a,b}, Fernando Maya^{a,*}, Víctor Cerdà^a, Luz O. Leal^b

^a Laboratory of Environmental Analytical Chemistry—LQA2, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain

^b Environment and Energy Department, Advanced Materials Research Center, Miguel de Cervantes 120, 31136 Chihuahua, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

3D printing
Chromium (VI)
Solid-phase extraction
Multisyringe flow injection analysis
Water analysis

ABSTRACT

A 3D printed device for the fully automated disk-based solid-phase extraction (SPE) of Cr (VI) from water samples has been fabricated. The compatibility of the use of organic solvents for analyte elution with 3D printed flow devices based on polymers fabricated using stereolithography has been evaluated. The developed methodology comprises the complexation of Cr (VI) with 1, 5-diphenylcarbazide (DPC) in acidic medium and the subsequent retention of the complex in a SBD-RPS disk contained within the 3D printed device. A multisyringe flow injection analysis system with online spectrophotometric detection has been used for the automation of the method. The fabricated 3D printed device integrates the different components of the flow analysis manifold, including connectors and mixers, being a powerful approach towards the reproducible construction of highly integrated flow-based manifolds.

The extracted Cr (VI)-DPC complex is eluted with a mixture of methanol- sulfuric acid and quantified at 540 nm. The effect on the analytical signal and the optimization of variables were evaluated using multivariate and univariate techniques. A detection limit of 1 ng Cr (VI) and a linear working range of 3.2–600 ng Cr (VI) were obtained using a sample volume of 2 ml. The intra-day and inter-day RSDs were 4.8% ($10 \mu\text{g L}^{-1}$, $n = 12$) and 3.4% ($n = 5$, different day with a different disk), respectively. The applicability of the fabricated 3D printed device has been proved by the determination of Cr (VI) in groundwater, surface water and leachates.

1. Introduction

There is a considerable interest in the development of methods of extraction and determination of Cr (VI), due to the high toxicity showed by this ion at low concentration levels [1–3]. The presence of Cr (VI) in environmental samples has increased due to the diverse applications of this ion in manufacturing processes, and therefore the human exposure to this toxic and carcinogenic ion is increasing [4]. In the environment, Cr (VI) is found as CrO_4^{2-} , HCrO_4^- or $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, on depending of physicochemical parameters such as pH and oxidation-reduction potential, as well as the type of sample. [5,6].

The monitoring of Cr (VI) at trace levels in environmental and food samples is required due to its high toxicity. Different analytical methodologies have been standardized for the determination of Cr (VI) [7–10]. In order to achieve higher selectivity and sensitivity in the determination of Cr (VI) different methods are used for its preconcentration and/or separation [11]. Preconcentration techniques for Cr (VI) include liquid-liquid extraction (LLE) [12–16], cloud point extraction [17,18], hollow fiber microextraction [19], emulsification

liquid phase microextraction method [20], supported liquid membrane [21] and solid-phase extraction (SPE) [1,5,11,21–37].

Among them, SPE plays a crucial role in sample pretreatment, providing low solvent consumption, high preconcentration efficiencies, high reproducibility, low cost and reduction of processing times [38,39]. In addition, SPE can be easily automated, not requiring of phase separation devices as in LLE techniques [40,41]. Different sorbent materials have been used for the SPE of Cr (VI) including particulated resins [5,11,22–25,32,34–37,42], disks [26], graphene [1], carbon nanotubes [27,31], magnetic nanoparticles [28] and other inorganic materials (zirconium, alumina) [29,30,33]. Disk-based SPE allows the use of high sample flow rates, increases analyte mass transfer, and reduces the back pressure in flow-based systems [41,43].

SPE of Cr (VI) can be performed by direct extraction of the analyte in an appropriate ion exchange support, or indirectly after Cr (VI) complexation. The chromogenic reaction of the complex between Cr (VI) and 1–5-diphenylcarbazide (DPC) is highly selective, used for the extraction of Cr (VI) followed by spectrophotometric detection [22,23,44].

* Corresponding author.

E-mail address: fernando.maya@uib.es (F. Maya).

A recent trend in the improvement of sample preparation devices is their fabrication using 3D printing techniques [45,46]. Among the different types of 3D printing, stereolithography (SLA) is particularly versatile and is currently applied to the design of new devices in different fields, such as microfluidics, or biomedical engineering [47,48]. The design and fabrication of 3D printed devices by SLA for analytical applications is currently increasing, including the development of novel devices for the SPE of metals [49–51]. The combination of 3D printed devices with flow-based techniques opens new avenues in the miniaturization and integration of automated analytical methods [49,51,52].

Multisyringe flow injection analysis (MSFIA) is a robust and versatile flow technique, enabling the full automation of analytical methods, with high analysis throughputs and low reagent consumption [53–55]. Among the different types of sample treatments automated with the MSFIA technique, disk-based SPE enabled good preconcentration efficiencies at higher flow rates than those obtained with typically packed bed SPE cartridges [51,56–59].

In the present study, the preconcentration and determination of Cr (VI) in water samples has been carried out by combining the MSFIA technique with a 3D printed device integrating disk-based SPE. The retained Cr (VI)-DPC complex is eluted by acidic methanol followed by the spectrophotometric detection of the complex. The stability of SLA 3D printed devices for the development of SPE methods involving the use of organic solvents has been evaluated.

2. Experimental section

2.1. Reagents

All chemicals used were of analytical reagent grade. Millipore quality water (18.2 M Ω cm of resistivity) was used throughout this work. Cr (VI) standards were prepared from a stock solution of 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Cr (VI) by dilution in 4% HNO₃ (65%, w/w, reagent grade). Stock solution (1 L) was prepared from potassium dichromate (99.9%) and contains 40 ml HNO₃ 65%. To ensure the acid medium suitable for complex formation, samples and standard solutions also contained 4% HNO₃.

The solution of chromogenic reagent was prepared daily by weighing the amount required of 1, 5-diphenylcarbazide (DPC, reagent grade) dissolved in 20 ml of methanol and diluted to 100 ml with water. The eluent was prepared by slowly adding 16.67 ml H₂SO₄ (96%, w/w, reagent grade) to 80 ml methanol (99.9%, HPLC grade) and diluting with water up to a volume of 100 ml.

C18 bonded silica, polystyrenedivinylbenzene (SDB-XC) and polystyrenedivinylbenzene reversed phase sulfonated (SDB-RPS) disks from 3 M Empore were used as SPE sorbents.

Ammonium iron (III) sulfate dodecahydrate (99%), sodium chloride (99.5%), sodium nitrate (98%), sodium carbonate anhydrous (99.8%), sodium sulfate anhydrous (99.5%), sodium phosphate dibasic (99%), ethylenediaminetetraacetic acid (99%) and standards solutions (atomic absorption grade) of Cd (II), Co (II), Cr (III), Cu (II), Pb (II), Mn (II), Ni (II), V (V), Al (III), Zn (II), Hg (II) and Mo (VI) were used for the study of possible interferences.

Isopropyl alcohol (99%) was used to remove unreacted monomers from the 3D printed devices.

2.2. Manifold and instruments

A schematic depiction of the developed MSFIA system with the designed 3D printed SPE device is shown in Fig. 1. The system is composed by a multisyringe burette (BU4S; Crison Instruments, Barcelona, Spain) with 16,000 steps and equipped with three glass syringes moving simultaneously. Each syringe is connected to a three-way solenoid valve (N-Research, Caldwell, NJ, USA) to direct liquids to the reservoir, or to the flow network. Glass syringes of 5 ml (S1, S3) and 2.5 ml (S2) (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) were used. The MSFIA

manifold has an external three-way solenoid valve (Takasago Electric Inc., Nagoya, Japan) for sample loading. Polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing 0.8 mm i.d. was used to connect the different valves and the detector to the 3D printed device. A holding coil (HC) with a volume of 10 ml (connected between V1 and V4) used for sample loading and the connections from the valves to the reservoirs were made of PTFE 1.5 mm i.d.

The detection system comprises a portable CCD spectrophotometric detector USB 2000 (Ocean Optics, USA), a green LED with wavelength of 525 nm (Gallium nitride) as light source, and a flow cell (Starna, Haninalt, UK) with a 10-mm optical path. The absorbance was measured at 540 nm with an integration time of 5 ms. A correction wavelength of 600 nm was selected due to the narrow wavelength range of the LED used as light source.

Instrument control, data acquisition and processing were carried out using the software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems, Bunyola, Spain). Statistica 6 (Statsoft, USA) was used for data analysis in the multivariate optimization.

2.3. Analytical procedure

The analytical procedure for the preconcentration and determination of Cr (VI) is detailed in Table 1 and summarized as it follows: the sample is loaded in the holding coil (HC) using V1 and V4 in position “on”. Subsequently, the V1 and V2 are activated in position “on” to pump the sample and the chromogenic reagent inside the 3D printed device, i.e. the sample is mixed with the chromogenic reagent (solution of DPC-20% methanol, S2) for the formation of the complex inside the integrated mixer of the 3D printed device, and the reaction product is retained on the sorbent disk. In the next step, data acquisition starts, and the eluent (S3) is pumped through the sorbent disk for the elution and subsequent quantification of the analyte by activating V3 at position “on”. Finally the carrier (water, S1) is injected to rinse the sorbent disk and the flow cell before to start the next measurement.

2.4. Design of 3D printed SPE device

The design of the 3D printed device for SPE is based on previous work [36] with some modifications. The design is described below: Part 1. - Contains a confluence point and a mixer for the formation of the Cr (VI)-DPC complex prior to SPE and a second confluence point after the mixer for introduction of the eluent; Part 2.- This part contains a support based on a matrix of cubes to accommodate the SPE disk.

The design and dimensions of the device are shown in Fig. 2, and they are summarized as follows: the dimensions of Part 1 are 30.2 mm + 7 mm \times 12.18 mm \times 21 mm (length + length of thread \times thread diameter \times width). This part includes a mixer based on a matrix of interconnected cubes with the following dimensions 12.2 mm \times 2.1 mm (length \times width). The dimensions of cubes are 0.4 mm of size, 0.3 mm of separation between cubes and 0.05 mm of superposition. Part 2 dimensions are 31.9 mm \times 21 mm (length \times width). This part has a support based on a truncated cone composed by a matrix of interconnect cubes. Cube measurements are 0.9 mm \times 0.5 mm \times 0.2 mm (size \times separation \times superposition); the truncated cone has a size of 1 mm \times 7 mm \times 3.7 mm (smaller diameter, larger diameter, height). Finally, the threads measured 6.52 mm \times 7 mm (diameter \times length) and the flow channels have 1 mm of internal diameter.

Rhinoceros 5 SR11 32 software (McNeel & Associates, USA) was used to design the 3D printed devices. A Form 1 + 3D printer (Formlabs Inc. Somerville, USA), Clear Photoactive resin (Formlabs) and Preform software (Formlabs) were used. Unreacted monomers remaining in the channels of the 3D printed device were rinsed with isopropyl alcohol using a HPLC pump (Waters, Milford, USA). After rinsing, the 3D printed devices were dried at room temperature for 15 min and cured in a CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP, Upland, Canada) for 8–10 h using lamp with a wavelength of 365 nm.

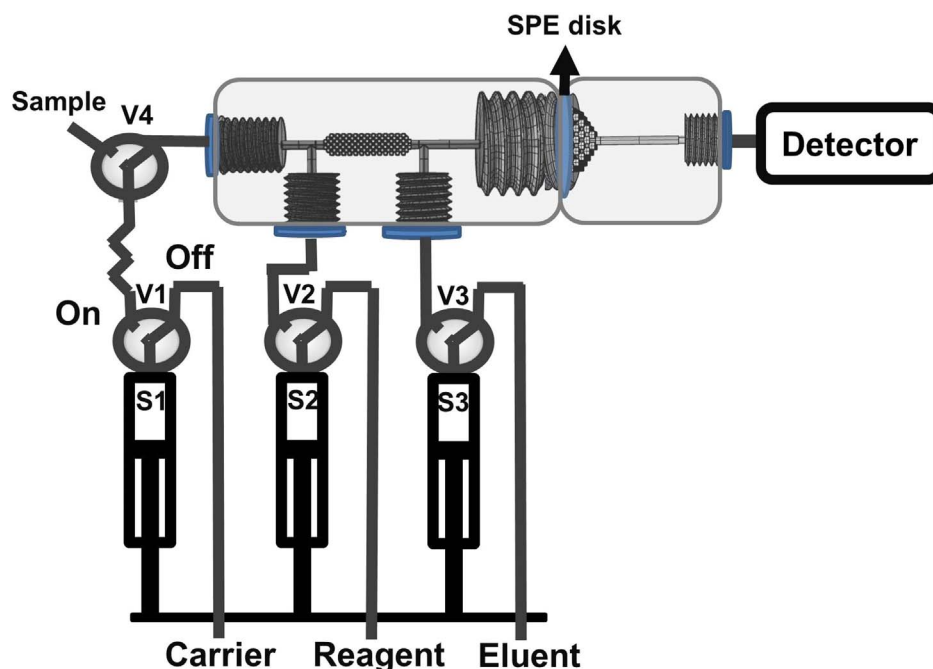


Fig. 1. Schematic depiction of the instrumental set-up for the preconcentration and determination of Cr (VI). V1-V4: Three-way solenoid valves; S1-S3: Syringes; HC: Holding coil; SPE Disk: Sorbent disk for retention of analyte.

The 3D printing conditions are as follows: printing time 187 min (2 pieces) and 228 min (4 pieces), 744 layers, resolution of 0.05 mm, vertical position and without stand. Files containing the designed extraction devices are available in the [Supporting Information](#).

2.5. Evaluation of the compatibility of the 3D printed device with organic solvents

The compatibility of different organic solvents with the fabricated 3D printed devices was evaluated in order to study their viability as eluents in the developed analytical method for the determination of Cr (VI). Chloroform, carbon tetrachloride, acetone, hexane, xylene, methanol, ethanol, acetonitrile and ethyl acetate were evaluated. 0.6 g of the 3D printed polymer was immersed in 10 ml of each one of the selected solvents. After 1 h, significant damage of the 3D printed device was observed using acetone and chloroform. After 6 days, pure methanol and acetonitrile just produced small cracks in the 3D printed device. Other organic solvents tested did not cause any visible damage of the 3D printed device after 6 days.

3. Results and discussion

3.1. Initial conditions for preconcentration

The spectrophotometric determination of Cr (VI) was carried out exploiting the formation of Cr (VI) – DPC complex in acidic medium

previous to its extraction on a sorbent disk. Preliminary SPE studies were directed towards the selection of the type of sorbent disk, and the composition of the eluent.

C18 bonded silica (C-18), polystyrenedivinylbenzene (SDB-XC) and polystyrenedivinylbenzene partially sulfonated (SDB-RPS) disks were evaluated as potential sorbents for the retention Cr (VI) - DPC complex. The retention percentage was calculated from the breakthrough obtained when pumping the Cr (VI) - DPC complex through the different disks. For C18 and SDB-XC disks a poor retention of the Cr (VI) - DPC complex was observed. However, the SDB-RPS disk showed the best performance for the extraction of the Cr (VI) - DPC complex reaching almost a 100% retention percentage, as it is shown in Fig. 3a. The complex extracted is a charged cationic chelate $\text{Cr}(\text{DPC})_2^+$. The aromatic rings of SDB-XC and SDB-RPS, as well as the alkyl-chains of the C18 sorbents have π - π interactions with the aromatic rings of the Cr (VI) -DPC complex. However, the sulfonic acid groups present in the SDB-RPS sorbent can establish electrostatic interactions with the Cr (VI) -DPC complex, enhancing the retention of the complex.

Solutions of organic solvents (80% methanol; 80% ethanol), acid solutions ($0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$) and mixtures of organic solvents with acids ($0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ and $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ in combination with 80% methanol, or 80% ethanol) were evaluated for the elution of the Cr (VI) - DPC complex from the SDB-RPS disk (Fig. 3b). Pure methanol or ethanol, were not tested, in order to avoid mid/long-term problems of stability of the 3D printed polymer device, as well as to minimize the production of bubbles within the flow

Table 1
Analytical procedure for preconcentration and determination of chromium (VI) by the developed MSFIA set-up.

Step	Instruction	Pump	Valve position				Volume (ml)	Flow rate (ml min^{-1})
			V1	V2	V3	V4		
1	Sample loading	Pick up	On	Off	Off	On	2	2
2	Formation and retention of the Cr (VI) – DPC complex in the 3D printed device	Dispense	On	On	Off	Off	3	0.5
3	Start data acquisition							
4	Elution and analyte quantification	Dispense	Off	Off	On	Off	1	0.5
5	Rinsing of the system with carrier	Dispense	On	Off	Off	Off	1	2
6	Stop data acquisition							

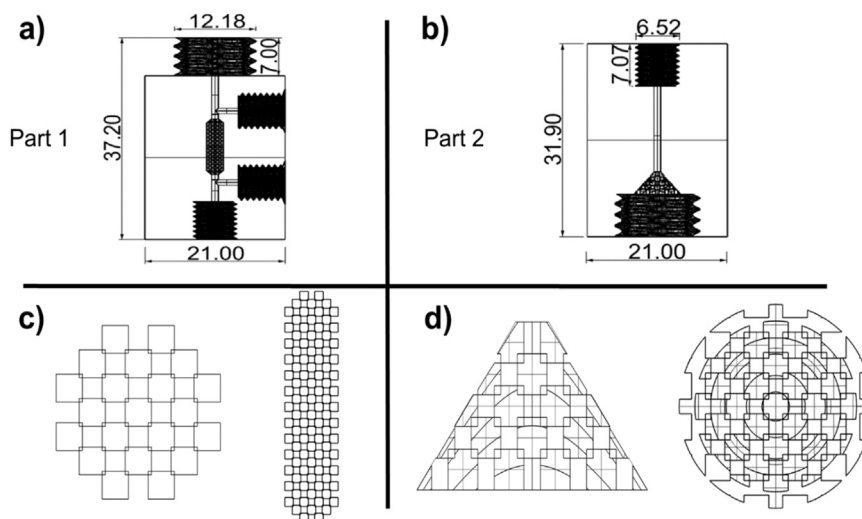


Fig. 2. Parts and dimensions of the 3D printed device for disk-based SPE. a) Part 1 of device for the formation of complex and injection of the eluent, dimensions in mm; b) Part 2 support for the sorbent disk; c) Mixer based on interconnected cubes; d) Design of the support for sorbent disk based on a truncated cone.

conduits. Best recoveries for the Cr (VI) - DPC complex were obtained using $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - 80% ethanol and $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - 80% methanol, showing no significant differences. However, just the $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - 80% methanol eluent enabled an appropriate signal reproducibility, selecting this eluent for further experiments. Signal reproducibility problems using $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - 80% ethanol were caused by the generation of bubbles in the conduits of the flow system.

3.2. Optimization of experimental conditions for the preconcentration and determination of Cr (VI)

3.2.1. Univariate optimization

In order to study the effect of the different operational parameters comprising the proposed method, univariate and multivariate studies were carried out. The concentration of acid (HNO_3) in the sample medium, and the amount of methanol in the eluent were evaluated by means of univariate studies.

The concentration of HNO_3 in the sample provides the acidic medium required in the formation of the Cr (VI) - DPC complex ($\text{pH} \approx 2$)

[7]. In addition, the use of HNO_3 , HCl and H_2SO_4 was evaluated for sample acidification. No significant differences on the measured analytical signals were observed. Therefore, HNO_3 was selected for further experiments due to their easier handling and preparation. The HNO_3 concentration was studied in the range from 0% to 5% (v/v). As shown in Fig. 4a, the HNO_3 concentration has a positive effect on the signal measured, and the net absorbance increased by increasing the percentage of HNO_3 in the sample medium up to a 4%, selecting this concentration for further experiments.

The percentage of methanol in the eluent was evaluated in the range from 0% to 80%. (v/v). Methanol percentages higher than 80% were not studied due to the release of bubbles in the flow conduits. As shown in Fig. 4b, the elution performance was improved by increasing the amount of methanol up to the maximum value studied, selecting this value for further experiments.

3.2.2. Multivariate optimization

The H_2SO_4 concentration in the eluent, extraction and elution flow rates, DPC concentration and eluent volume were optimized to determine the optimum values for Cr (VI) determination using

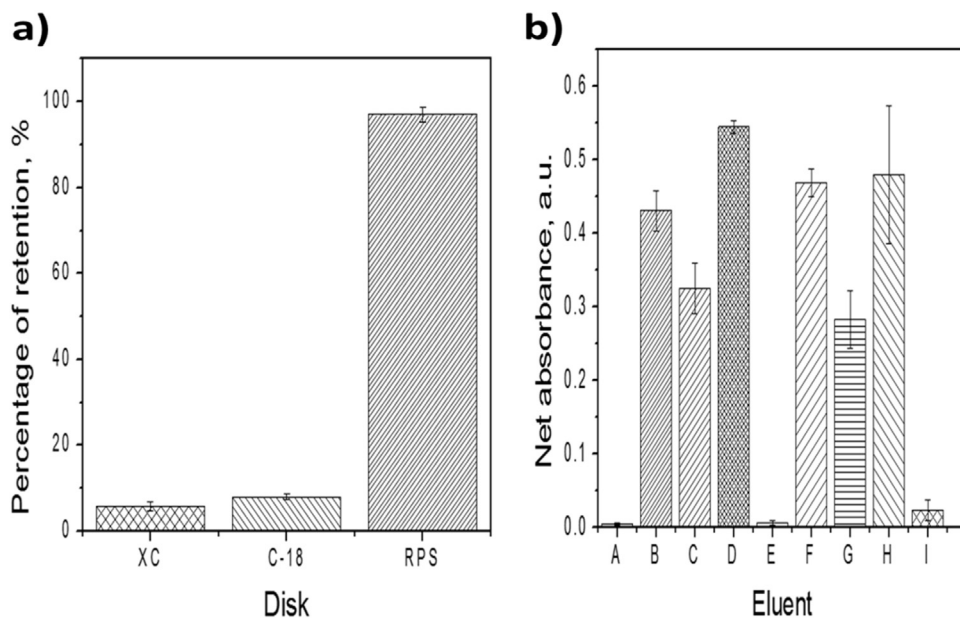


Fig. 3. Selection of the type of disk and the eluent for Cr (VI) determination: a) Comparison between disks for Cr (VI) - DPC preconcentration; b) Eluent selection; A: 80% methanol; B: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ - 80% methanol; C: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ - 80% methanol; D: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - 80% methanol; E: 80% ethanol; F: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ - 80% ethanol; G: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ - 80% ethanol; H: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ - 80% ethanol; I: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$. Results are expressed as mean of three determinations.

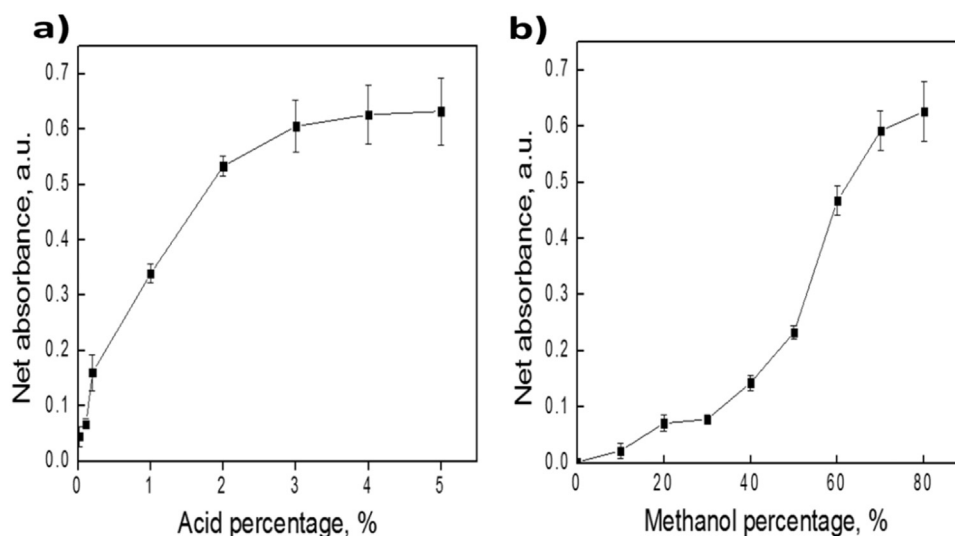


Fig. 4. Study of the a) HNO_3 percentage in the sample medium and b) the methanol percentage in the eluent.

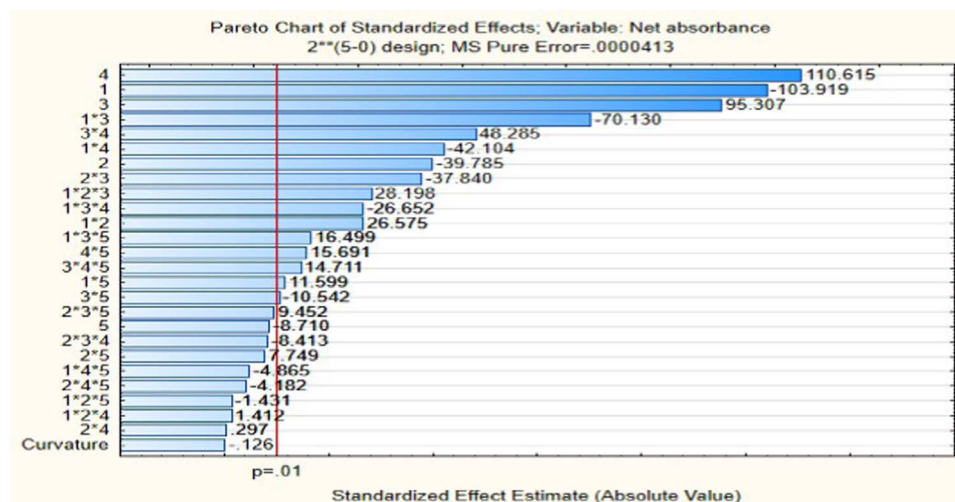


Fig. 5. Pareto chart of the 2^5 screening analyzing net absorbance for the determination of Cr (VI). Confidence interval of 99% ($p = 0.01$). 1: extraction flow rate; 2: elution flow rate; 3: H_2SO_4 concentration; 4: DPC concentration; 5: eluent volume. *: second or third order interaction.

multivariate methods. The statistical analysis was carried out as it follows: First stage, a screening method was applied to find the independent variables and interactions between them affecting significantly the analytical signal (absorbance, obtained as peak height). A 2^k full factorial design was used for 5 variables (2^5 ; 32 experiments), including 3 central points (to evaluate the repeatability of the measurements). The studied ranges were $0.5\text{--}2.5\text{ mol L}^{-1}$ for the H_2SO_4 concentration, $0.5\text{--}2.5\text{ ml min}^{-1}$ for the extraction and elution flow rates, $2.5 \times 10^{-3}\text{--}1.75 \times 10^{-2}\%$ for the DPC concentration (w/v) and $0.5\text{--}3.5\text{ ml}$ for the eluent volume, the table of the experiments carried out for this design is in the supplementary material (Table S1). A total of 35 experiments were performed and results were analyzed through the Pareto Chart (Fig. 5).

The data are fitted to a linear model including third-order interactions, eluent volume, the lack of fit and curvature are not significant with a confidence interval of 99%, and therefore the variables can be analyzed in a linear way. The equation of the model stage is shown in the Supplementary material. The evaluation of this factorial design demonstrated that for these experimental conditions, extraction and elution flow rates are significant having a negative effect on the analytical signal. Therefore the minimum flow rate enabled by the multi-syringe pump used in combination with a 5 ml syringe (0.5 ml min^{-1})

was adopted for further experiments. The H_2SO_4 and DPC concentrations are significant with a positive effect and to obtain the optimal values should be studied towards the maximum limit of the screening range for both variables, therefore we use a response surface method to optimize these two variables.

In the second stage, a Doehlert matrix was performed for two variables (H_2SO_4 and DPC concentration) including three center points, as a statistical method of response surface analysis. Doehlert matrix is based on a hexagonal design with two variables, which allows exploiting the most important factor in a larger number of levels [60]. The new ranges for this study are $1.5\text{--}3.5\text{ mol L}^{-1}$ H_2SO_4 and $0.01\text{--}0.025\%$ DPC concentration (w/v). A total of 9 experiments were performed and the results were analyzed by desirability function (d), using net absorbance as dependent variable (Fig. 6). This function varied from 0 to 1, with the purpose of obtaining the highest net absorbance, $d = 1$ was established as the maximum signal of the complex that can be reached. Data were adjusted to a linear-quadratic model with interactions of second order and evaluated in a confidence interval of 95%. H_2SO_4 and DPC concentration show a maximum at 0 and 0.433 (coded values), respectively, corresponding to 3 mol L^{-1} H_2SO_4 and 0.0175% DPC (w/v). These optimized values were adopted for further experiments.

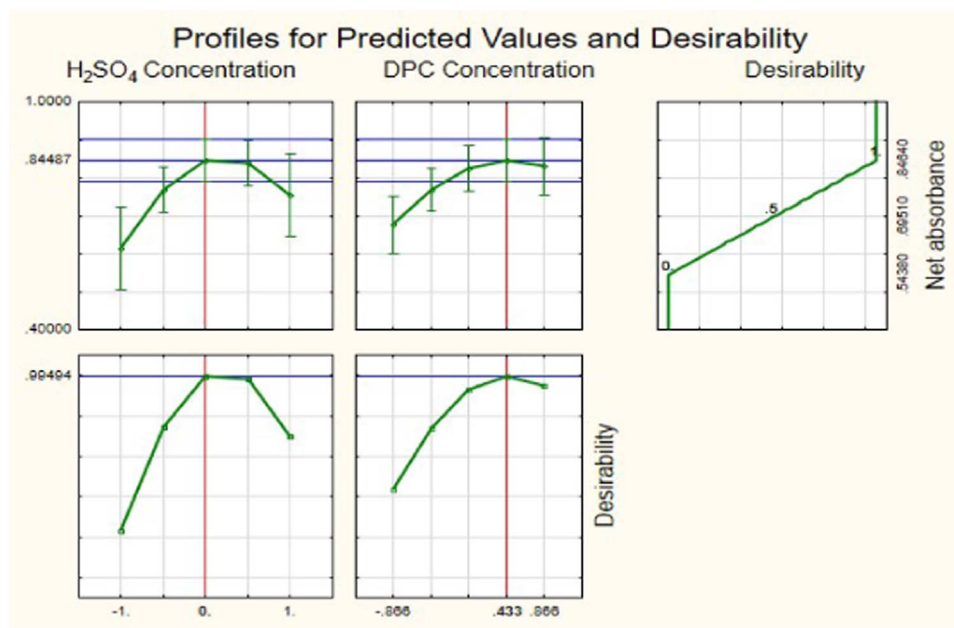


Fig. 6. Desirability chart of Doehlert Matrix for the determination of Cr (VI) by the proposed method. Confidence interval of 95% ($p = 0.05$).

3.3. Analytical features

Analytical features were established under optimum experimental conditions for the developed method and are summarized in Table 2. The calibration curve for Cr (VI) determination was obtained with statistically satisfactory results [$y = 0.0032$ (ng Cr (VI)) + 0.0421, net absorbance vs Cr (VI) concentration, $n = 10$, $R^2 = 0.9994$], with a linear working range from 3.2 ng to 600 ng Cr (VI). The limit of detection (LOD) was 1.0 ng of Cr (VI) (sample volume, 2 ml), calculated from three times the standard deviation of ten replicates of the blank divided by the slope of calibration curve. The preconcentration response was linear from 2 ml to 16 ml of sample volume ($70 \mu\text{g L}^{-1}$). LOD expressed in concentration units was $0.0625 \mu\text{g L}^{-1}$ for a sample volume of 16 ml.

The intra-day precision was calculated as the relative standard deviation (RSD) at two different levels of analyte concentration ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ and $70 \mu\text{g L}^{-1}$, $n = 12$) using 2 ml of sample, obtaining 4.8% and 3.1%, respectively. On the other hand, the inter-day precision was calculated from the results obtained (2 ml sample volume) on different working days ($n = 5$) using a different sorbent disk each day and obtaining a 3.4% RSD. The precision and sensitivity of the proposed method is similar, or better than those obtained by previous automated work with spectrophotometric detection (Table S2) [12,14–16,21,31,33–37].

The analysis throughput was 6 h^{-1} using a 2 ml of sample volume. The average lifetime of a sorbent disk was studied by performing

successive injections of 2 ml of a $70 \mu\text{g L}^{-1}$ Cr (VI) standard solution. The sorbent disk was reused 49 times with recoveries close to 95%. A study of saturation of sorbent disk was performed by passing 1 ml of sample containing $70 \mu\text{g L}^{-1}$ Cr (VI) after complexation with DPC through the disk while measuring the analyte breakthrough. A total volume of 88 ml of this Cr (VI) standard solution were pumped with no apparent breakthrough. Larger volumes produced overpressure in the system, since a large amount of the Cr (VI) - DPC complex is obstructing the interparticle voids of the sorbent disk.

3.4. Interferences

The effect of different anions and cations was studied to evaluate potential interferences. A variation of a 10% of the analytical signal was established as a criterion for the tolerance level. The cations Cd (II), Co (II), Cr (III), Cu (II), Pb (II), Mn (II), Ni (II), V (V), Al (III), Zn (II), Hg (II), Mo (VI) and Fe (III) were selected for this study. For Zn (II), Pb (II), Co (II), Mo (VI) and Hg (II), a 1000:1 tolerance ratio was established. V (V) presented a positive interference with a tolerance level of 500:1. The Fe (III) ion caused a positive interference in relation 1:1. Therefore, $2.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ of EDTA was added to eliminate this interference achieving a tolerance level of 1000:1. The ions Cu (II), Cd (II), Ni (II), Al (III), Cr (III) and Mn (II) showed no significant interference at a 1000:1 tolerance ratio.

In the case of anions, sulfate, nitrate, phosphate, carbonate and chloride were tested. For chloride ion a tolerance ratio of 70,000:1 was established, while for the other anions tested a 15,000:1 tolerance ratio.

3.5. Validation and application of the proposed method to water samples

The developed method was evaluated by analyzing 3 different types of water samples. Four groundwater samples, a surface water sample and two landfill leachates, were analyzed. These samples were taken from different locations of Mallorca, Spain. All samples were acidified with 4% HNO_3 and were filtered through a Nylon filter ($0.45 \mu\text{m}$). Due to the presence of Fe (III) and other potentially interfering ions, $2.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ EDTA was added. A sample volume of 2 ml was used and three replicates for each sample were carried out. Samples were analyzed using the developed method compared with the Standard Method

Table 2
Analytical features of the optimized method for the preconcentration and determination of Cr (VI).

Analytical parameters	Cr (VI)
Detection limit (ng)	1.0
Quantification limit (ng)	3.2
Linear working range (ng)	3.2 – 600
Sensitivity (UA, $\mu\text{g L}^{-1}$)	0.0032
Intra-day RSD ($n = 12$), %	4.8 ^a /3.1 ^b
Inter-day RSD ($n = 5$), %	3.4
Injection throughput	6
Disk durability (injections)	49

^a Lower level ($10 \mu\text{g L}^{-1}$).

^b Higher level ($70 \mu\text{g L}^{-1}$).

Table 3
Application of the developed method for the determination of Cr (VI) in different types of water samples.

Sample	Developed method			Standard method ^a Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Added ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recovery (%)	
Groundwater 1	0	< LOD		< LOD
	70	73 \pm 3	104	68 \pm 0
Groundwater 2	0	< LOD		< LOD
	70	72 \pm 2	103	68 \pm 0
Groundwater 3	0	< LOD		< LOD
	70	73 \pm 0	104	68 \pm 0
Groundwater 4	0	< LOD		< LOD
	70	69 \pm 1	99	68 \pm 0
Surface water	0	8.7 \pm 0.4		< LOD
	70	80 \pm 1	101	82 \pm 1
Leachate 1	0	10 \pm 0		< LOD
	70	78 \pm 3	97	85 \pm 4
Leachate 2	0	52 \pm 3		54 \pm 1
	70	116 \pm 6	95	125 \pm 1

Sample volume 2 ml; Results are expressed as mean of three determinations \pm Standard deviation.

^a LOD of the standard method: 36.8 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Table 4
Analysis of groundwater samples by the proposed method using 8 ml of sample volume.

Sample	Added ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recovery (%)
Groundwater 1	0	0.84 \pm 0.03	
	5	6.0 \pm 0.4	103
	10	10.6 \pm 0.6	98
Groundwater 2	0	0.54 \pm 0.04	
	5	5.6 \pm 0.4	101
	10	10.6 \pm 0.4	100
Groundwater 3	0	1.5 \pm 0.10	
	5	6.8 \pm 0.4	105
	10	12.1 \pm 0.5	105
Groundwater 4	0	< LOD	
	5	5.2 \pm 0.2	104
	10	10.5 \pm 0.3	105

Results are expressed as mean of three determinations \pm standard deviation.

also based on the spectrophotometric detection of the Cr (VI) – DPC complex following a manual procedure [10].

The results are detailed in Table 3. Recoveries obtained for Cr (VI) from the different samples were satisfactory, and ranged from 95% to 105%. The concentration of Cr (VI) in the samples was below the LOD of the standard method (36.8 $\mu\text{g L}^{-1}$), except for the sample of leachate #2. Therefore, since Cr (VI) was present in the sample at an adequate level to be quantified by both methods, these were directly compared showing no significant differences between the obtained results.

3.6. Evaluation of groundwater samples

Groundwater samples from the previous stage were used for the evaluation of proposed method using a larger preconcentration volume of 8 ml of sample. Trace levels of Cr (VI) were detected in three of the samples analyzed. Each sample was analyzed again after spiking with two different concentrations of Cr (VI). As is shown in Table 4, satisfactory recoveries were obtained in all instances. The range of recovery percentage was from 98% to 105%.

4. Conclusions

Disk-based SPE integrated in a 3D printed device enabled the preconcentration and determination of Cr (VI) with satisfactory analytical results. The structure of the 3D printed devices was not significantly

affected by the use of organic solvents in the elution step (methanol/water, 80/20, v/v). The derivatization and preconcentration of Cr (VI) were carried out in a single device without the need of additional flow accessories, achieving low detection limits. Through the use of integrated mixers in the 3D printed device, the formation of the Cr (VI) DPC complex within the 3D printed device was achieved without requiring of additional reaction coils. The developed method is an effective, simple and miniaturized alternative for the determination of Cr in water samples.

Acknowledgements

The Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and the European Funds for Regional Development (FEDER) are gratefully acknowledged for financial support through Project CTQ2016-47461-R. C.C. acknowledges to the National Council of Science and Technology in Mexico (CONACYT) for the allowance of a grant. E. Palacio is acknowledged for the provision of water samples.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.065>.

References

- [1] H. Sereshti, M. Vasheghani Farahani, M. Baghdadi, Trace determination of chromium(VI) in environmental water samples using innovative thermally reduced graphene (TRG) modified SiO₂ adsorbent for solid phase extraction and UV–vis spectrophotometry, *Talanta* 146 (2016) 662–669.
- [2] S. De Flora, Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis, *Carcinogenesis* 21 (2000) 533–541.
- [3] M. Costa, C.B. Klein, Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans, *Crit. Rev. Toxicol.* 36 (2006) 155–163.
- [4] H. Zhang, Q. Liu, T. Wang, Z. Yun, G. Li, J. Liu, G. Jiang, Facile preparation of glutathione-stabilized gold nanoclusters for selective determination of chromium (III) and chromium (VI) in environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* 770 (2013) 140–146.
- [5] Ş. Tokaloğlu, S. Arsav, A. Delibaş, C. Soykan, Indirect speciation of Cr(III) and Cr(VI) in water samples by selective separation and preconcentration on a newly synthesized chelating resin, *Anal. Chim. Acta* 645 (2009) 36–41.
- [6] M. Szabó, J. Kalmár, T. Ditrói, G. Bellér, G. Lente, N. Simic, I. Fábán, Equilibria and kinetics of chromium(VI) speciation in aqueous solution – A comprehensive study from pH 2 to 11, *Inorg. Chim. Acta* (2017).
- [7] International Organization for Standardization, ISO 11083:1994 Water quality – Determination of chromium(VI) – Spectrometric method using 1,5-diphenylcarbazide(1995).
- [8] International Organization for Standardization, ISO 18412:2005 Water quality – Determination of chromium(VI) – Photometric method for weakly contaminated water (2005).
- [9] International Organization for Standardization, ISO 23913:2006 Water quality – Determination of chromium(VI) – Method using flow analysis (FIA and CFA) and spectrometric detection (2006).
- [10] D. de Santos, Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, *Apha-Awwa-Wpcf*, Edición. 17 (1992).
- [11] S. Şahan, Ş. Saçmacı, Ş. Kartal, M. Saçmacı, U. Şahin, A. Ülgen, Development of a new on-line system for the sequential speciation and determination of chromium species in various samples using a combination of chelating and ion exchange resins, *Talanta* 120 (2014) 391–397.
- [12] W. Chen, G. Zhong, Z. Zhou, P. Wu, X. Hou, Automation of liquid-liquid extraction-spectrophotometry using prolonged pseudo-liquid drops and handheld CCD for speciation of Cr(VI) and Cr(III) in water samples, *Anal. Sci.* 21 (2005) 1189–1193.
- [13] H. Chen, P. Du, J. Chen, S. Hu, S. Li, H. Liu, Separation and preconcentration system based on ultrasonic probe-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for determination trace amount of chromium(VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 81 (2010) 176–179.
- [14] C. Henriquez, B. Horstkotte, P. Solich, V. Cerda, In-syringe magnetic-stirring-assisted liquid-liquid microextraction for the spectrophotometric determination of Cr (VI) in waters, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 6761–6769.
- [15] M. Alexovic, V. Andrich, I.S. Balogh, J. Sandrejova, A single-valve sequential injection manifold (SV-SIA) for automation of air-assisted liquid-phase microextraction: stopped flow spectrophotometric determination of chromium(vi), *Anal. Methods* 5 (2013) 2497–2502.
- [16] Y. Luo, S. Nakano, D.A. Holman, J. Ruzicka, G.D. Christian, Sequential injection wetting film extraction applied to the spectrophotometric determination of chromium(VI) and chromium(III) in water, *Talanta* 44 (1997) 1563–1571.
- [17] L. Zhang, X. Li, X. Wang, W. Wang, X. Wang, H. Han, Preconcentration and determination of chromium species by cloud point extraction-flame atomic absorption

- spectrometry, *Anal. Methods* 6 (2014) 5578–5583.
- [18] K. Pytlakowska, V. Kozik, M. Dabioch, Complex-forming organic ligands in cloud-point extraction of metal ions: a review, *Talanta* 110 (2013) 202–228.
- [19] C. Zeng, Y. Lin, N. Zhou, J. Zheng, W. Zhang, Room temperature ionic liquids enhanced the speciation of Cr(VI) and Cr(III) by hollow fiber liquid phase micro-extraction combined with flame atomic absorption spectrometry, *J. Hazard. Mater.* 237–238 (2012) 365–370.
- [20] E. Yilmaz, M. Soylak, Ultrasound assisted-deep eutectic solvent based on emulsification liquid phase microextraction combined with microsample injection flame atomic absorption spectrometry for valence speciation of chromium(III/VI) in environmental samples, *Talanta* 160 (2016) 680–685.
- [21] K. Ndung'u, N.-K. Djane, F. Malcus, L. Mathiasson, Ultrasonic extraction of hexavalent chromium in solid samples followed by automated analysis using a combination of supported liquid membrane extraction and UV detection in a flow system, *Analyst* 124 (1999) 1367–1372.
- [22] A. Tunçeli, A.R. Türker, Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in water after pre-concentration of its 1,5-diphenylcarbazone complex on amberlite XAD-16 resin and determination by FAAS, *Talanta* 57 (2002) 1199–1204.
- [23] V.N. Bulut, C. Duran, M. Tufekci, L. Elci, M. Soylak, Speciation of Cr(III) and Cr(VI) after column solid phase extraction on Amberlite XAD-2010, *J. Hazard. Mater.* 143 (2007) 112–117.
- [24] E. Rossi, M.I. Errea, M.M.F. de Cortalezzi, J. Stripeikis, Selective determination of Cr (VI) by on-line solid phase extraction FI-SPE-FAAS using an ion exchanger resin as sorbent: an improvement treatment of the analytical signal, *Microchem. J.* 130 (2017) 88–92.
- [25] G. Peng, Q. He, Y. Lu, J. Huang, J.-M. Lin, Flow injection microfluidic device with on-line fluorescent derivatization for the determination of Cr(III) and Cr(VI) in water samples after solid phase extraction, *Anal. Chim. Acta* 955 (2017) 58–66.
- [26] T. Inui, K. Fujita, M. Kitano, T. Nakamura, Determination of Cr(III) and Cr(VI) at sub-ppb levels in water with solid-phase extraction/metal furnace atomic absorption spectrometry, *Anal. Sci.* 26 (2010) 1093–1098.
- [27] M. Tuzen, M. Soylak, Multiwalled carbon nanotubes for speciation of chromium in environmental samples, *J. Hazard. Mater.* 147 (2007) 219–225.
- [28] M. Bhaumik, A. Maity, V.V. Srinivasu, M.S. Onyango, Enhanced removal of Cr(VI) from aqueous solution using polypyrrole/Fe₃O₄ magnetic nanocomposite, *J. Hazard. Mater.* 190 (2011) 381–390.
- [29] H. Maltez, E. Carasek, Chromium speciation and preconcentration using zirconium (IV) and zirconium(IV) phosphate chemically immobilized onto silica gel surface using a flow system and F AAS, *Talanta* 65 (2005) 537–542.
- [30] N. Rajesh, B. Deepthi, A. Subramaniam, Solid phase extraction of chromium(VI) from aqueous solutions by adsorption of its ion-association complex with cetyltrimethylammoniumbromide on an alumina column, *J. Hazard. Mater.* 144 (2007) 464–469.
- [31] M. Rosende, M. Miró, M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, V. Cerdà, Highly integrated flow assembly for automated dynamic extraction and determination of readily bioaccessible chromium(VI) in soils exploiting carbon nanoparticle-based solid-phase extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2217–2227.
- [32] P.A. Sule, J.D. Ingle, Determination of the speciation of chromium with an automated two-column ion-exchange system, *Anal. Chim. Acta* 326 (1996) 85–93.
- [33] M.C. Pannain, R.E. Santelli, On the spectrophotometric flow injection determination of chromium(VI) in natural waters after on-line preconcentration on activated alumina, *Talanta* 42 (1995) 1609–1617.
- [34] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Continuous ultrasound-assisted extraction of hexavalent chromium from soil with or without on-line preconcentration prior to photometric monitoring, *Analyst* 127 (2002) 1115–1120.
- [35] J. Ma, B. Yang, R.H. Byrne, Determination of nanomolar chromate in drinking water with solid phase extraction and a portable spectrophotometer, *J. Hazard. Mater.* 219–220 (2012) 247–252.
- [36] S.W. Jung, H.W. Lim, C.H. Kang, Y.W. Choi, Spectrophotometric determination of ultra trace tri & hexavalent chromium by using on-line flow injection analysis with dual pre-concentration column, *Bull. Korean Chem. Soc.* 32 (2011) 3437–3442.
- [37] S.P.-J.J. Grudpan Kate, Worakijcharoenchai Ngarmnet, Tue-Ngeun Orawan, Flow injection spectrophotometry for speciation of Cr(VI) and Cr(III) using diphenylcarbazide and solid phase extraction with C18 in-valve mini-column, *ScienceAsia* 25 (1999) 99–106.
- [38] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid phase extraction of organic compounds: a critical review. part i, *Trends Anal. Chem.* 80 (2015) 1–42.
- [39] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review. part ii, *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 655–667.
- [40] F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollon, S.C.G.N. Braga, New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 14–23.
- [41] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media, *TrAC Trends Anal. Chem.* 77 (2016) 23–43.
- [42] N. Rajesh, R.K. Jalan, P. Hotwany, Solid phase extraction of chromium(VI) from aqueous solutions by adsorption of its diphenylcarbazide complex on an Amberlite XAD-4 resin column, *J. Hazard. Mater.* 150 (2008) 723–727.
- [43] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerda, Interfacing on-line solid phase extraction with monolithic column multisyringe chromatography and chemiluminescence detection: an effective tool for fast, sensitive and selective determination of thiazide diuretics, *Talanta* 80 (2010) 1333–1340.
- [44] S.-I. Ohira, K. Nakamura, C.P. Shelor, P.K. Dasgupta, K. Toda, Simultaneous electroanalytical preconcentration and speciation of chromium(III) and chromium(VI), *Anal. Chem.* 87 (2015) 11575–11580.
- [45] S. Waheed, J.M. Cabot, N.P. Macdonald, T. Lewis, R.M. Guijt, B. Paull, M.C. Breadmore, 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers, *Lab Chip.* 16 (2016) 1993–2013.
- [46] A.I. Shalhan, P. Smejkal, M. Corban, R.M. Guijt, M.C. Breadmore, Cost-effective three-dimensional printing of visibly transparent microchips within minutes, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3124–3130.
- [47] R. Amin, S. Knowlton, A. Hart, B. Yenilmez, F. Ghaderinezhad, S. Katebifar, M. Messina, A. Khademhosseini, S. Tasoglu, 3D-printed microfluidic devices, *Biofabrication* 8 (2016) 22001.
- [48] F.P.W. Melchels, J. Feijen, D.W. Grijpma, A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering, *Biomaterials* 31 (2010) 6121–6130.
- [49] C.-K. Su, P.-J. Peng, Y.-C. Sun, Fully 3D-printed preconcentrator for selective extraction of trace elements in seawater, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6945–6950.
- [50] E. Mattio, F. Robert-Peillard, C. Branger, K. Puzio, A. Margailan, C. Brach-Papa, J. Knoery, J.-L. Boudenne, B. Coulomb, 3D-printed flow system for determination of lead in natural waters, *Talanta* 168 (2017) 298–302.
- [51] 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.
- [52] A.K. Au, N. Bhattacharjee, L.F. Horowitz, T.C. Chang, A. Folch, 3D-printed microfluidic automation, *Lab Chip.* 15 (2015) 1934–1941.
- [53] B. Horstkotte, O. Elsholz, V. Cerdà, Review on automation using multisyringe flow injection analysis, *J. Flow. Inject. Anal.* 22 (2005) 99.
- [54] V. Cerda, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerda, *Flow Analysis: a Practical Guide*, Newnes, 2014.
- [55] V. Cerdà, R. Forteza, J.M. Estela, Potential of multisyringe flow-based multi-commutated systems, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 35–45.
- [56] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, Multi-pumping flow system for the determination, solid-phase extraction and speciation analysis of iron, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 33–39.
- [57] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, Expert multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron using chelating disks in water samples, *Anal. Chim. Acta* (2004) 79–88.
- [58] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples, *Talanta* 66 (2005) 210–217.
- [59] W.L. Castilleja-Rivera, L. Hinojosa-Reyes, J.L. Guzmán-Mar, A. Hernández-Ramírez, E. Ruíz-Ruiz, V. Cerdà, Sensitive determination of chromium (VI) in paint samples using a membrane optode coupled to a multisyringe flow injection system, *Talanta* 99 (2012) 730–736.
- [60] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76 (2008) 965–977.



Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction

Carlos Calderilla ^{a, b}, Fernando Maya ^{a, c}, Luz O. Leal ^b, Víctor Cerdà ^{a, *}

^a Department of Chemistry, University of the Balearic Islands, Cra.Valldemossa km 7.5, 07122, Palma de Mallorca, Spain

^b Environment and Energy Department, Advanced Materials Research Center, Miguel de Cervantes 120, 31136, Chihuahua, Mexico

^c Australian Centre for Research on Separation Science (ACROSS), School of Natural Sciences-Chemistry, University of Tasmania, Private Bag 75, Hobart, TAS, 7001, Australia



ARTICLE INFO

Article history:

Available online 22 September 2018

Keywords:

Solid-phase extraction
Flow analysis techniques
Automated sample pretreatment
3D printing
Magnetic sorbents
Membranes
Monoliths

ABSTRACT

Automated flow-based solid-phase extraction (SPE) is an advantageous tool for analytical sample pretreatment, and the development of novel materials and fabrication techniques to build improved SPE devices are crucial to further advance the field. Additive manufacturing (3D printing) is offering tremendous advantages in comparison with conventional manufacturing techniques, enabling the fast and efficient fabrication of complex SPE devices. In addition, novel materials, and less conventional SPE supports, have also emerged as interesting alternatives for automated SPE, such as magnetic particles, stirred extraction devices, membranes/disks and monolithic supports. In this review, the advantages, limitations and future directions of 3D printing and novel materials and devices for automated flow-based SPE are discussed, highlighting recently developed applications.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Solid-phase extraction (SPE) is a versatile sample preparation technique for analyte preconcentration and sample matrix removal [1]. High analyte preconcentration factors, simplicity of operation, low cost of instrumentation, high selectivity, low consumption of reagents, low waste generation, and facile automation are intrinsic features of SPE [2,3]. The advantages of SPE have been improved further by the miniaturization of the extraction procedure by developing solid-phase microextraction techniques [4,5]. Silica and polymer beads are the most typical physical supports for SPE, and the particle size/morphology and packing format are critical features for the development of efficient SPE applications. There is a growing interest to develop novel formats of extraction supports, to improve the analytical features of resulting analytical methods, as well as to further miniaturize the extraction system [6–8]. In addition, SPE applications using less conventional materials are constantly developed [9], including carbon nanostructures [10,11], or porous crystalline metal-organic frameworks (MOFs) [12,13].

The most widely used extraction format for automated SPE are extraction columns packed with beads of silica-C18, or organic polymers. Alternatively, disks based on the entrapment of functional beads using a polymer binder have been also widely used

[14]. Extraction disks enabled the simple automation of the SPE procedure, obtaining a high extraction performance using higher flow rates. Recently, less conventional materials have been explored for flow-based SPE including sorbents with magnetic properties [13], novel forms of porous carbons [15], or macroporous organic polymer monoliths [16], aiming to improve the analytical features and overcoming the limitations of typical sorbents used for flow-based SPE.

Apart from classic cartridge/disk SPE, other extraction formats have been developed, including solid-phase microextraction (SPME) [17], thin film microextraction (TFME) [18], microextraction by packed sorbent (MEPS) [19], magnetic solid-phase extraction (MSPE) [20], and stir bar sorptive extraction (SBSE) [21], among others. In regard to SPE automation, flow analysis techniques [22,23], such as flow injection analysis (FIA) [24], sequential injection analysis (SIA) [25], multicommutated flow systems [26], multisyringe flow injection analysis (MSFIA) [27], multi-pumping flow systems (MPFS) [28], or the lab-on-valve (LOV) technique [29], play a crucial role. After automated SPE, analyte quantification is carried out integrating the detector in the flow manifold, or hyphenating the flow system to chromatographic [30], or atomic spectrometric instrumentation [31]. Another alternative is the integration of low-pressure liquid chromatographic separations in the manifold of syringe-based flow techniques [32–34].

3D printing based on the additive layer-by-layer manufacturing of polymers is a cost-effective and promising tool for the fast

* Corresponding author.

E-mail address: victor.cerda@uib.es (V. Cerdà).

Abbreviations			
CF	Carbon foams	MMR	Magnetic mechanical robotic
DAD	Diode array detector	MOF	Metal-organic framework
DLP	Digital light processing	MPFS	Multipumping flow system
FAAS	Flame atomic absorption spectrometry	MSC	Multisyringe chromatography
FIA	Flow injection analysis	MSFIA	Multisyringe flow injection analysis
FLD	Fluorescence detection	MSPE	Magnetic solid-phase extraction
FDM	Fused deposition modeling	MWCNT	Magnetic multi-walled carbon nanotubes
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrometry	PDMDPS	Poly (dimethyldiphenylsiloxane)
GMA-co-EDMA	Glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate	PVDF	Polyvinylidene difluoride
GC-MS	Gas chromatography –mass spectrometry	SBD-RPS	Poly (styrene-divinylbenzene) reversed-phase sulfonated
HPLC	High performance liquid chromatography	SEM	Scanning electron microscope
ICP-MS	Inductively coupled plasma-mass spectrometry	SIA	Sequential injection analysis
LDH	layered double hydroxide	SIC	Sequential injection chromatography
LIF	Laser induced fluorescence	SLA	Stereolithography
LOP	Lab-on-paper	SSE	Stirred sorbent extraction
LOV	Lab-on-valve	SPE	Solid-phase extraction
MIL	Materials Institute Lavoisier	UiO	Universitetet i Oslo
MIP	Molecularly imprinted polymers	UV	Ultraviolet detector
		ZIF	Zeolitic imidazolate framework

fabrication of complex analytical devices [35–38]. Device designs can be easily shared and 3D printing in different laboratories [39,40]. 3D printed fluidic devices are promising tools in the analytical chemistry field, including sample pretreatment [40,41].

In this work, we critically discuss recently developed applications of automated flow-based SPE, including recent trends on new sorbents materials and novel manufacturing technologies, emphasizing their advantages and limitations. Fig. 1 shows a timeline of the main developments made on flow-based automated SPE in the last 5 years.

2. 3D printing

The development of 3D printed SPE devices is based on the design of extraction supports accommodating commercial sorbents, or the use of the 3D printed material itself as SPE sorbent. The resins used for 3D printing are mainly acrylate-based polymers, which have been explored as a sorbent for the direct extraction of metals (Fig. 2a,b) [42]. In this work, a fully 3D printed preconcentrator with an intricate structure based on an interconnected network of tiny cubes was fabricated, increasing the effective analyte extraction area. The 3D printed device was fabricated using the stereolithography (SLA) technique, based on the layer-by-layer photopolymerization of liquid resins using a UV light source [42].

The automated extraction system consisted on a flow injection analysis (FIA) manifold integrating the 3D printed device to directly extract different metals (Mn, Ni, Zn, Cu, Cd, and Pb) on the acrylate-based 3D printed polymer. The detection of metals is accomplished by coupling the FIA system with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Fig. 2a). Direct SPE of metals in the 3D printed device showed low detection limits, a high extraction efficiency, tolerance to highly saline medium and the use of high extraction flow rates.

3D printed devices were also explored as supports for commercial sorbents for the extraction of metals. In a first example, a modular 3D printed flow system for the extraction and determination of lead was fabricated by assembling 3 different 3D printed parts [43]: (1) support for the extraction resin with a column shape, (2) reactor/mixer and (3) detection unit/flow cell. The MPFS technique was used for liquid handling, and a commercial Pb resin was packed in the 3D printed device. After SPE, the reaction of lead with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol was used for the spectrophotometric determination of the analyte in water samples. The combination of the MPFS technique with this modular 3D printed device, enabled a low detection limit for the determination of lead, obtaining a low cost and portable analyzer. Calderilla et al. [44], integrated SPE extraction disks into a modular SLA 3D printed device, combining iron speciation, SPE and derivatization. The analytical method was

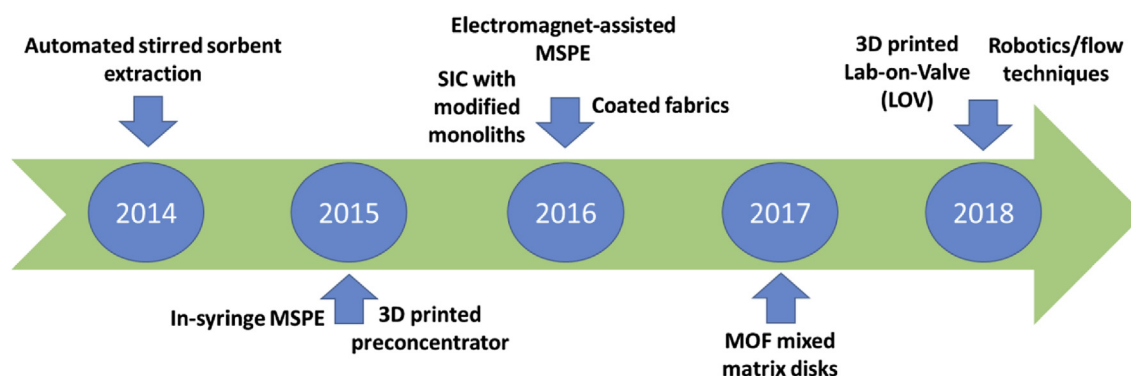


Fig. 1. Timeline of recent developments on automated SPE using flow analysis techniques.

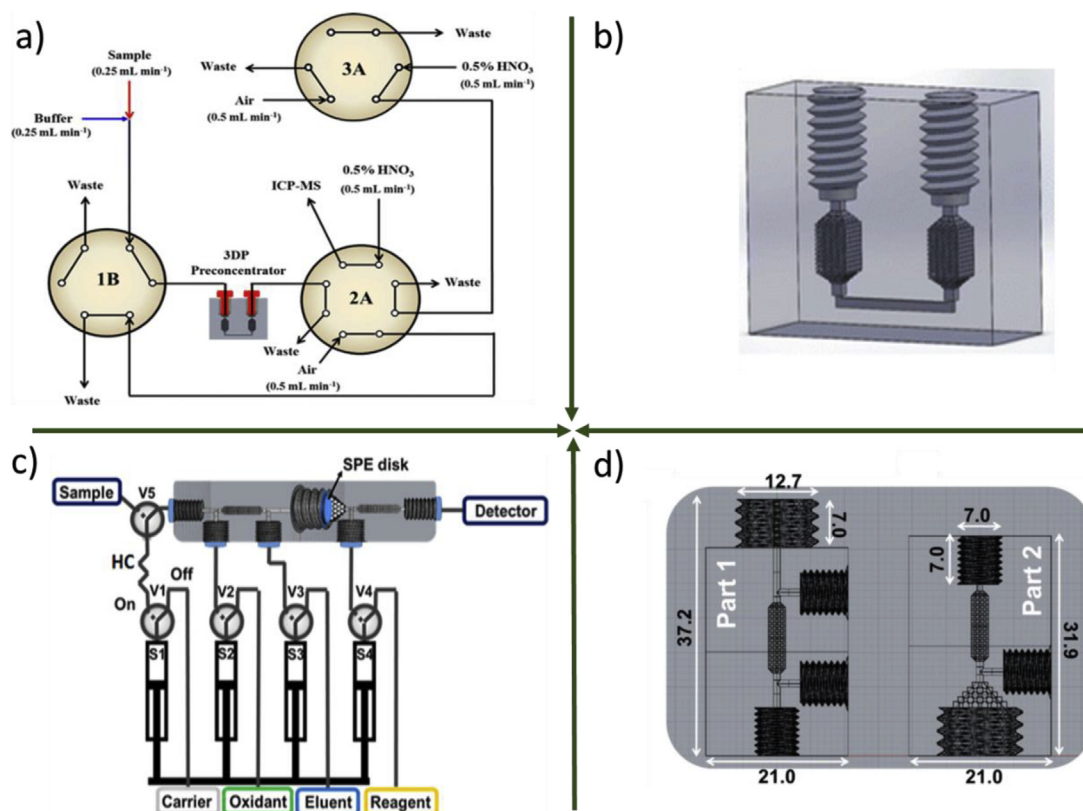


Fig. 2. 3D printed SPE devices implemented using flow analysis techniques. a) FIA system with 3D printed device for the extraction of trace metals; b) 3D printed preconcentrator for extraction of metals; c) MSFIA with a 3D printed device including disk-based SPE for iron determination; d) 3D printed device for disk-based SPE (dimensions in mm). (a, b) Adapted from Ref. [42] with permission from the American Chemical Society. (c, d) Adapted from Ref. [44] with permission from Elsevier.

automated using the MSFIA technique with spectrophotometric detection (Fig. 2c). The 3D printed device consisted in two assembled parts. The first part contained a mixer and two confluence points for the introduction of reagents. The confluence point placed before the mixer enabled the oxidation of Fe (II) to Fe (III) using H_2O_2 , and the confluence point situated after the mixer was used to inject the eluent after SPE. The second part was used as support to accommodate the SPE disk, featuring a confluence point to mix the eluate with the chromogenic reagent and a mixer to develop the reaction product for analyte detection. Mixers in both parts are based of cubes shaping interconnected networks (Fig. 2d). The 3D printed device replaced typical elements of flow networks, such as tubing and connectors, by a monolithic device with the different elements integrated. Following the same approach, a 3D printed device containing a SPE disk was fabricated for the preconcentration and determination of chromium (VI) in water samples [45]. In this example, a poly(styrene-divinylbenzene) reversed phase sulfonated (SDB-RPS) disk was selected as sorbent to retain the Cr (III) - 1, 5-diphenylcarbazone complex formed from the reaction of Cr (VI) with 1,5 diphenylcarbazide using an acidic water/methanol solution as the eluent. The effect of organic solvents on the durability of the 3D printed device was evaluated by using up to an 80% of methanol in the eluent, observing no premature damage of the extraction device.

Lab-on-paper (LOP) [46] and lab-on-valve (LOV) [29] formats have evolved towards 3D printed platforms. An evaluation of different printing techniques including Polyjet technology, SLA and digital light processing (DLP) was carried out to fabricate a 3D printed LOV [47]. The DLP technique was selected to print the LOV device, since it produced channels with a smoother surface compared to the other techniques evaluated. DLP also enabled the

3D printing of an integrated mixing coil with the required design without obstruction of the LOV channels. The 3D printed LOV was mounted on the selection valve of a MSFIA manifold with fluorescence detection and applied to water samples for the simultaneous preconcentration of lead and cadmium using two commercial resins (Pb resin and Amberlite® IRC748). In a different work, a 3D printed microflow injection system mounted on a selection valve and incorporating a microcolumn for magnetic SPE was developed and hyphenated to high performance liquid chromatography (HPLC) for the extraction and determination of antimicrobials [48]. LOP technology emerged due to the need of cheaper, portable and robust diagnostic platforms [49]. Granica et al. (2018) [50], developed a 3D printed holder made by FDM to encase a paper-based FIA system (Fig. 3), enabling continuous flow of carrier/sample through the LOP device. The future incorporation of sorbents to the paper support, could be interesting to integrate SPE in LOP devices.

Samples with complex composition, such as samples with a high saline content or crude oil/emulsions, have been analyzed using 3D printed devices coupled to automatic systems with mass spectrometry detection [40]. A device printed by FDM was used for pretreatment of crude oil and oil-brine emulsions achieving the preconcentration of maltenes. Coupling the FIA technique with the 3D printed device and GC-MS (or GC-FID) the reduction of the pretreatment time 10-fold with respect to standard methods was achieved. In addition, it was demonstrated the robustness of the 3D printed material (polylactic acid) to non-polar solvents. Regarding to the pretreatment of samples with high saline content, Su et al. (2018) proposed a SLA 3D printed minicolumn based on a commercial resin (BV-007, Miicraft) containing TiO_2 nanoparticles [51]. The addition of TiO_2 improved the extraction of arsenic and selenium from water and urine samples, exploiting a FIA-ICP-MS system.

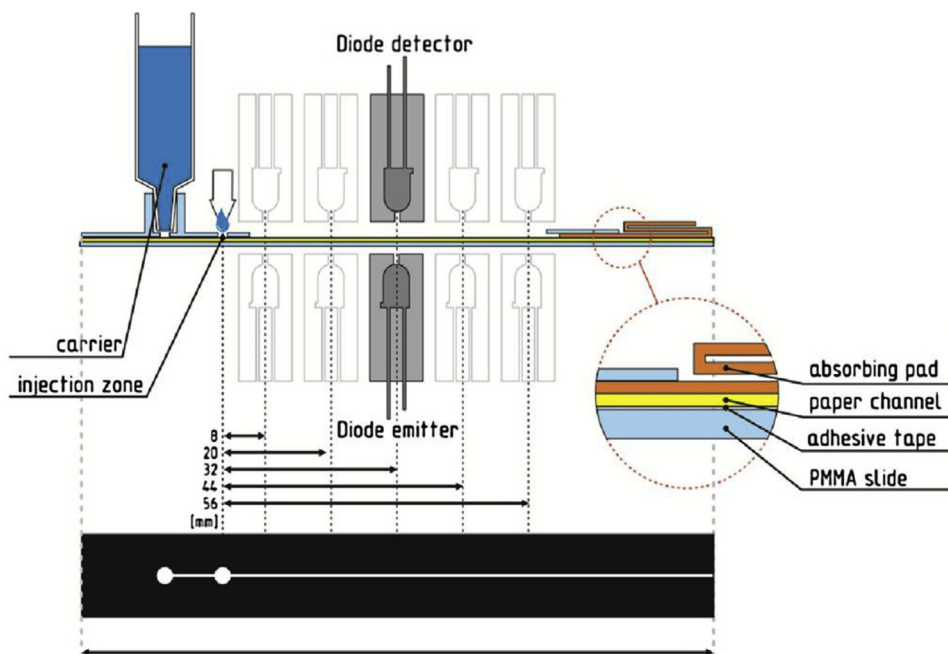


Fig. 3. Lab on Paper technique based on the combination of the FIA technique and a 3D printed device. Adapted from Ref. [50] with permission of Elsevier.

Recent developments on 3D printing for automated SPE using flow techniques are summarized in Table 1. To date, 3D printing applications for SPE have been mostly focused to the determination of inorganic species, and a more limited number, to the determination of organic compounds. It is attributed to the limited stability of 3D printed devices in typical organic solvents used as eluents in SPE. However, the first applications exploring the compatibility of organic eluents with 3D printed devices have been recently reported [45,48].

3. Magnetic sorbents

Magnetic solid-phase extraction (MSPE) [52], is a popular sample pretreatment based on the dispersion of a magnetic sorbent in the sample medium, and after the required extraction time, the

magnetic sorbent is easily retrieved from the sample matrix using an external magnetic field. The same procedure is repeated for sorbent washing and analyte elution. Advantages of MSPE are:

- (i) No bead packing is required since the magnetic sorbent is easily retrieved using an external magnetic field.
- (ii) No tedious filtration/centrifugation steps are required after analyte extraction, or elution.
- (iii) No limitations in sorbent size and shape. Particles with a very small size can be used, enhancing the effective extraction area.

To further improve MSPE applications, different attempts based on flow techniques have been developed recently to automate this sample pretreatment (Table 2). With the automation of the MSPE technique, tedious manual procedures are avoided, and the

Table 1
Applications of 3D printed devices for automated SPE using flow techniques.

SPE sorbent	3D printing technique	Flow technique/detection system	Analyte	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Application	Ref.
Printed resin (based on acrylates)	SLA	FIA-ICP-MS	Mn	0.0031	0.05–5	Seawater, estuarine water and river water samples	[42]
			Ni	0.0019	0.05–5		
			Cu	0.0005	0.05–5		
			Zn	0.0180	0.05–5		
			Cd	0.0009	0.001–0.1		
Pb-resin beads	SLA	MPFS-UV/Vis	Pb	2.7	3–120	Natural water samples	[43]
			Chelating disk	SLA	MSFIA-UV/Vis		
			Fe(III)			3	9–800
SDB-RPS disk	SLA	MSFIA-UV/Vis	Cr (VI)	0.5	1.6–300	Surface water, groundwater and leachate samples	[45]
Pb-resin and Amberlite®IRC748	DLP	MSFIA-LOV-FLD	Pb	0.17	0.17–20	Natural water samples	[47]
			Cd	0.2	0.2–15		
Polyaniline-coated magnetite nanoparticles	SLA	μ FIA-HPLC	Parabens and Triclosan	1.1–4.5	5–2000	Urine and saliva samples	[48]
Printed resin- TiO_2 nanoparticles	SLA	FIA-ICP-MS	As	0.004–0.033	0.1–10	Water and human urine samples	[51]
			Se	0.061–0.128	0.5–50		

Table 2
Applications of automated SPE with newly developed materials (membranes, magnetic materials, or monoliths), or using stirred sorbents.

Type of SPE	Material sorbent	Flow technique/ detection system	Analyte	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Application (samples)	Ref.
Magnetic sorbents	Commercial magnetic nanobeads	SIA-Electrochemical	Chlorpyrifos oxon	0.1	0.1–3.7	Lake water	[53]
	Zr-Fe-C magnetic nanoparticles	FIA-SIA-HPLC-FLD	Fluoroquinolone antimicrobial drugs	1.5–3.0	5–1000	Baby food	[54]
	MOF crystals- Fe_3O_4 nanoparticles	MSFIA-SIA-UV/Vis	Malachite green	12	40–2000	Drinking water, groundwater, tap water and trout fish	[55]
	Magnetic porous carbon derived from ZIF	MSFIA-SIA-GC/MS	Estrogens	2.2–3.8	7.5–1000	Wastewater	[56]
	Magnetic porous carbon derived from ZIF	SIA-UV/Vis	Anionic surfactants	17.5	50–1000	Natural water, groundwater and wastewater samples	[57]
Stirred sorbent extraction	$\text{Fe}_3\text{O}_4@Al_2O_3$ functionalized with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and sodium dodecyl sulfate	MMR-GFAAS	Cd	0.006	0.05–1	Edible oils	[58]
	Fe_3O_4 nanoparticles-oleic acid coated MIP	FIA-Chemiluminescence	Hydroquinone	0.079	0.2–100	Cream samples	[60]
	Fe_3O_4 - poly(ionic liquid)	FIA- HPLC	Food colorants	4.1–14	12–700	Food samples	[61]
	C18 disk	FIA-UV/Vis	Amaranth	220	600–10000		
	Montmorillonite with epoxy resin	SIA-HPLC-DAD	Acidic drugs	21.7–44.0	72.4–2000	Urine	[63]
Membranes	Sol-gel PDMDPS	FIA-FAAS	Pb	1.8	6–300	River water, costal seawater and ditch water	[66]
			Cd	0.4	1.2–60		
Monoliths	UiO-66- NH_2 -PVDF	SIA-HPLC-DAD	Chlorophenols	0.1	0.5–500	Groundwater	[67]
	LDH- Al_2O_3 -PVDF	SIA-HPLC-DAD	Phenolic acids	0.12–0.25	0.5–500	Grape juice and beers	[69]
	Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolith	SIC-UV	Proteins	0.003–0.006	0.03–7	Water	[72]
	Melamine-formaldehyde polymer- CFs	SIA-HPLC-DAD	Phenols	0.02–0.08	0.5–200	Well water, wastewater and leachate	[74]
	ZIF/ZnO-monolith	SIA-HPLC-DAD	Chlorophenols	0.12–0.35	1–200	Wastewater, rain and groundwater	[75]
	Molecularly imprinted polymer	FIA-Fluorimetry	1-hydroxypyrene	3.1	10–400	Urine	[76]

exposure and handling of nanoparticle-based sorbents is minimized. Typical sorbents for MSPE are based on Fe_3O_4 nanoparticles directly coated with the desired functional groups, or with a shell of the sorptive material.

In order to improve the reproducibility and facilitate the regeneration of the magnetic sorbent, Dominguez et al. [53] proposed an automatic system based on the SIA technique for organophosphate insecticide determination based on the retention of magnetic nanobeads (300 nm, Ademtech Kit) for SPE in a flow cell with agitation and electrochemical detection (Fig. 4a). Acetylcholinesterase enzyme was immobilized in magnetic beads and applied as sorbent, loaded in a flow cell with rotation achieved with a magnet and a DC motor. The system was designed with the purpose of ensuring the reproducibility of the extraction and avoiding the loss of beads in the system.

A fluidized reactor configuration was applied to automate MSPE (Zr-Fe-C magnetic nanoparticles) using a combination of SIA and FIA with a fluidized reactor (cylindrical – shaped polytetrafluoroethylene tube) coupled with a magnetic device for the retention of the magnetic sorbent (Fig. 4b). This system was applied to the determination of fluoroquinolones in baby food samples using HPLC-FLD. One of the main features of the system is the enhancement of the interaction between the particles and the analyte using air bubbles, generating movement within the fluid, not requiring of assisted stirring [54].

Automated MSPE was also carried out “in-syringe” using small porous crystals of the MOF MIL-100, based on the coordination of Cr (III) with trimesic acid [55]. MIL-100 magnetization was carried out by in situ growth of Fe_3O_4 nanoparticles within the pores of the MOF

crystals. The MSFIA technique was used for method automation using a small stir bar placed inside the syringe, which is stirred with a motor connected to the multisyringe pump. The magnetic MIL-100 crystals are initially immobilized to the stir bar and stirring creates a dispersion of the MIL-100 crystals enhancing the extraction process. MIL-100 crystals are retained again in the stir bar when the sample is discarded from the syringe. This technique enabled the application of small porous crystals as sorbents for automated dispersive SPE, with good repeatability and sorbent reusability. The “in-syringe” dispersive MSPE has also been evaluated using MOFs as precursors towards porous magnetic nanoporous carbons [56]. In this example, the ZIF-67 (Co (II) – 2-methylimidazole) was carbonized under an inert atmosphere obtaining a porous carbon containing magnetic cobalt nanoparticles. The ZIF-67 derived carbon was evaluated for the extraction of estrogens followed by GC-MS separation. The same material was also studied for the automated extraction of anionic surfactants based on the SIA technique with spectrophotometric detection [57]. In this work, the efficiency of the MSPE process was improved by the addition of an electromagnet to the automated system, enabling variable magnetic fields through the MSPE procedure.

Due to the development of robotics, improved mechanization of analytical systems has been achieved by lab-made magnetic mechanical robotic (MMR) systems [58]. The magnet for the retention of the magnetic nanoparticles is handled by the MMR device, and applied to the extraction of trace levels of cadmium. The automation of the system was carried out with the FIA technique with analyte quantification using GFAAS. Cadmium was extracted using $\text{Fe}_3\text{O}_4@Al_2O_3$ functionalized with 1-(2-pyridylazo)-2-

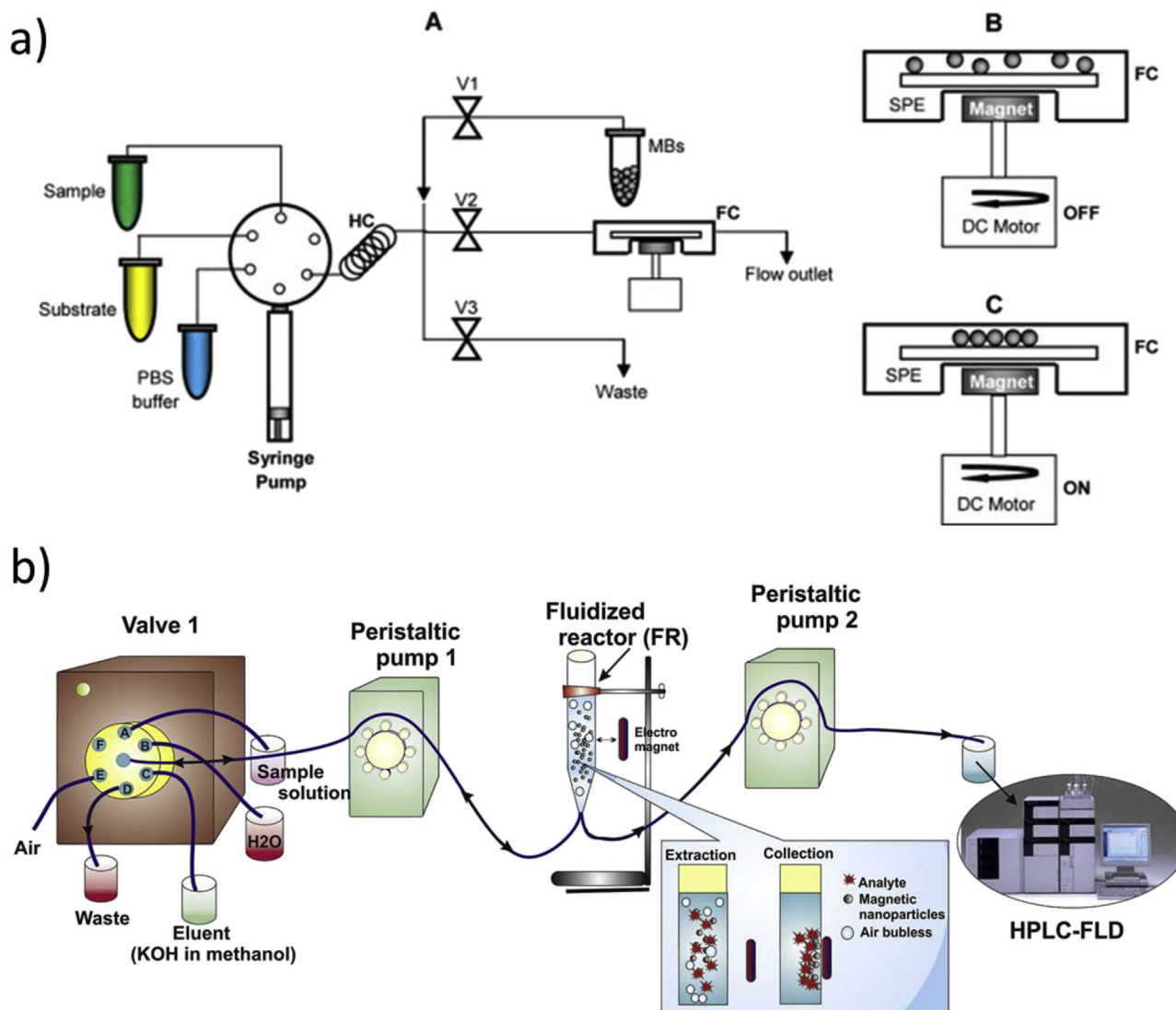


Fig. 4. a) SIA-MSPE set up (A), flow cell with switched off motor (B) and flow cell with switched on motor (C). b) Automated magnetic dispersive micro-solid phase extraction using a fluidized reactor applied to the determination of fluoroquinolones in baby food samples. Adapted from Refs. [53] and [54] with permission from Elsevier.

naphthol and sodium dodecyl sulfate, and samples of commercial oils were analyzed. The combination of robotics with flow analysis systems opens new possibilities for automated sample pretreatment, including solid- or liquid-phase extraction [59].

The combination of FIA systems with chemiluminescence detection was exploited for the determination of hydroquinone using Fe_3O_4 magnetic nanoparticles coated with a MIP [60]. Magnetic microspheres combining nanoparticles of Fe_3O_4 with an ionic liquid cross-linked polymer were also implemented for automated MSPE [61]. The extraction of synthetic food colorants with the magnetic microspheres in microcolumn format was carried out using a FIA system coupled to HPLC, or spectrophotometric detection. The application of prepared hybrid material in an automated flow-based extraction system showed a good reproducibility and an increase in extraction efficiency.

4. Stirred sorbent extraction

Stirred sorbent extraction (SSE) has been developed as a novel, simple, and efficient technique for analyte extraction in complex samples [62]. SSE was automated using the SIA technique for

determination of acidic drugs in urine followed by HPLC-UV separation [63]. A commercial sorbent disk was immobilized on a magnet for automatic rotating extraction. A C18 functionalized disk enabled the preconcentration of the selected analytes, requiring a shorter extraction time in comparison to other similar non-automated methodologies. The MSFIA technique was also applied to develop a method including a montmorillonite/epoxy coated stir bar for the extraction of chlorophenols [64]. The introduction of montmorillonite provided an enhanced effective extraction area on the surface of the stir bar, improving analyte extraction. The simultaneous use of two syringes increased the extraction throughput by enabling the quick draining of the extraction chamber using the second syringe installed in the flow-based manifold.

5. Extraction membranes and disks

Commercial extraction membranes and disks [14], have been widely used in automated flow-based SPE in flow-through mode [33], or incorporating them into optosensors [65]. Commercial disks are composed of a 90% of SPE beads entrapped in a 10% of Teflon, shaping a uniform disk. Less conventional sorbents for SPE

in membrane/disk format have been explored recently (Table 2). Disks based on a sol-gel coated fabric were applied to extract cadmium and lead from water samples followed by FAAS detection [66]. A silanol-terminated poly(dimethyldiphenylsiloxane) copolymer (PDMDPS) was selected as solid phase (Fig. 5a), and 4 different coatings for the sol-gel were evaluated for the retention of the ammonium pyrrolidine dithiocarbamate-Pb complex. The resulting SPE method was automated using the FIA technique (Fig. 5b), showing a high reproducibility and sensitivity.

The study of a mixed-matrix disk for automated SPE was proposed by Ghani et al. (2017) [67], preparing flow through sorbents based on the MOF UiO-66-NH₂ (composed by Zr (IV) coordinated with 2-aminoterephthalic acid) using polyvinylidene difluoride (PVDF) as polymer binder. The SIA technique was used to automate the SPE method based on MOF-based mixed-matrix disks (Fig. 5c). Mixed-matrix disks were fabricated with MOFs with different particle size and functional groups, including the use of nanoscale MOFs (Fig. 5d). MOF mixed-matrix disks showed a high extraction performance for phenols, with the best results obtained for MOFs with small particle size and amino functional groups present in the organic linker. This work opened the possibility of studying other types of materials, which can be combined with PDVF for the extraction of different analytes, such as MOF-derived etched carbons, developing improved applications for the removal of pollutants from water [68].

A similar type of mixed-matrix disk was developed for the preconcentration of phenolic acids [69]. In this case, a layered double hydroxide (LDH)-Al₂O₃-PVDF mixed-matrix disk was evaluated as sorbent material. SPE was carried out in a SIA manifold followed by HPLC-DAD separation, enabling the determination of 3,4-dihydroxybenzoic, *p*-hydroxybenzoic acid and gallic acid in grape juice and beers samples. Mixed-matrix disks are a versatile and simple way to prepare SPE flow-through supports with a high reproducibility, opening new possibilities for the use of less conventional micro/nanomaterials for SPE applications.

6. Monolithic extraction

Porous monolithic structures have been reported as efficient supports for sample preparation [70]. The high analyte mass transfer at relatively low back-pressures of monoliths, makes them suitable for low and medium pressure flow techniques [71]. Monoliths based on glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate (GMA-co-EDMA) have been modified with iminodiacetic acid enabling the separation of macromolecules (proteins) using syringe-based flow techniques [72]. A similar complexing porous polymer monolith was also applied for the online SPE of metals using a SIA system with electrochemical detection [73].

Another development of monolithic materials for SPE are the elastic carbon foams (CF), applied for the retention of

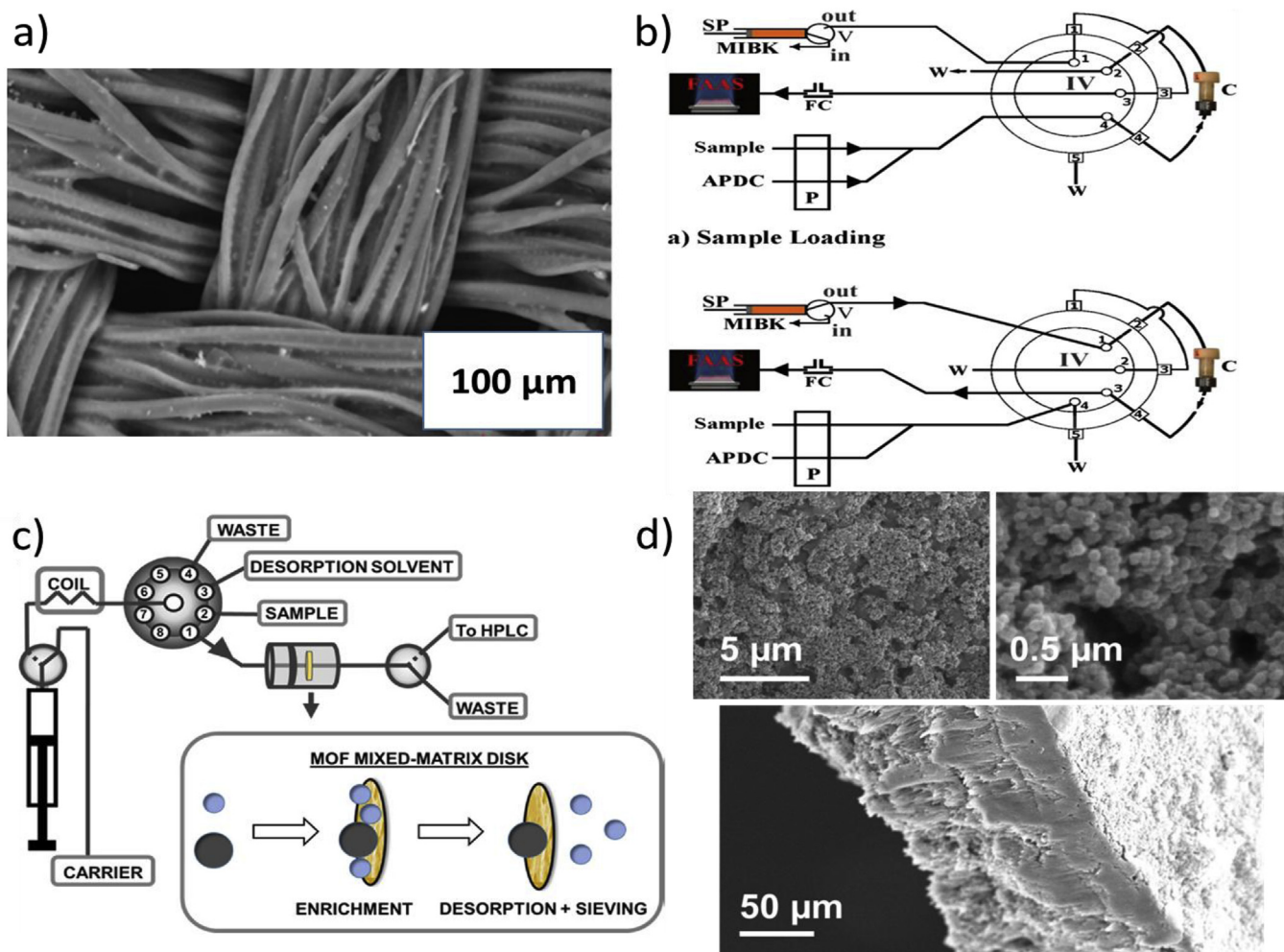


Fig. 5. Scheme of flow systems based on non-conventional flow-through membranes. a) SEM image of sol-gel PDMDPS coated fabric phase sorptive extraction media. b) FIA-SPE system based on sol-gel sorbent coated fabric; c) SIA system exploiting mixed-matrix disks based on MOFs. d) SEM image of a mixed-matrix SPE disk using nanoparticles of the MOF UiO-66-NH₂. Adapted from Refs. [66] and [67] with permission from Elsevier.

endocrine disrupting phenols using a SIA system (Fig. 6a) [74]. After elution, the eluate is analyzed off-line using HPLC-DAD. CFs are robust, efficient and durable materials obtained easily from the carbonization at controlled temperature under an inert atmosphere of commercially available melamine-formaldehyde foam. The obtained melamine polymer-derived CFs showed a superior extraction performance when compared with their melamine polymer precursors, or polyurethane foams (Fig. 6b).

Polymer monoliths were also combined with MOFs for automated sample preparation to extract chlorophenols from water samples [75]. MOFs were in situ grown on the surface of the pores monolith, based on the preliminary embedding of nanoparticles of a precursor metal oxide into monolith (Fig. 6c). Metal oxide nanoparticles are converted in situ by the reaction with basic MOF linkers, growing small and highly porous crystals on the pore surface of the precursor monolith (Fig. 6d). In a first example, the conversion of ZnO nanoparticles embedded in a polymer monolith was explored to grow the ZIF-8 crystals, using 2-methylimidazole as the organic linker. The resulting MOF/polymer monolith showed a higher performance for the flow-through extraction of chlorophenols in comparison to a pure polymer monolith, obtaining a low-pressure and high-performance support for flow-based SPE applications.

In a recent example a MIP monolith was implemented using the FIA technique for the separation and determination of 1-hydroxypyrene in biological samples (urine) [76]. 1-hydroxypyrene (template), methacrylic acid, ethylene glycol

dimethacrylate, 2, 2-azo(bis)isobutyronitrile and acetonitrile were the constituents of the monolith. After SPE, the analysis of the eluent was carried out using a fluorescence detector. The application of this material in automated SPE was evaluated with satisfactory results, opening the possibility for future developments of highly selective materials for automated SPE.

7. Conclusions and outlook

The development of novel technologies and materials implemented in flow analysis techniques contributed towards the miniaturization and the improvement of the analytical features of automated SPE (Table 3):

- (i) Recent advances on 3D printing enabled the fabrication of improved SPE supports. However, due to the limited surface area and functionality of 3D printed devices, classic sorbents (beads, magnetic particles, disks) are included in the 3D printed device to enable an efficient analyte extraction. A topic of current interest is the development of strategies to modify the 3D printed polymers to achieve higher versatility and extraction efficiency. The 3D printing of polymers containing functional monomers will open new avenues for the post 3D printing introduction of the desired functional groups. The development of 3D printing techniques with a higher resolution is also a need for the further miniaturization of the fabricated SPE devices. The development of coating procedures to immobilize commercial, or lab made

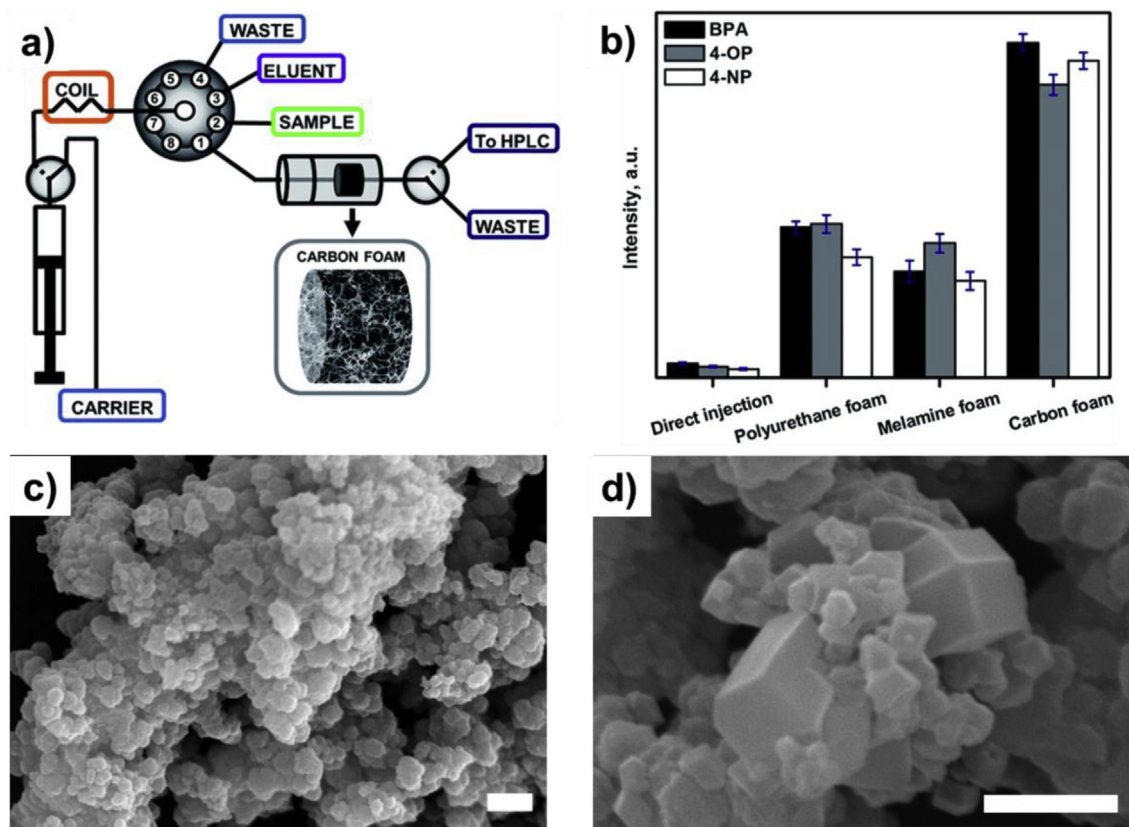


Fig. 6. a) SIA system for automated SPE using melamine polymer-derived CFs. b) Comparison of the extraction performance for bisphenol A (BPA), 4-tert-octylphenol (4-OP) and 4-n-nonylphenol (4-NP) using melamine polymer-derived CFs. c) SEM image of a polymer monolith containing embedded ZnO nanoparticles. d) SEM image of a polymer monolith after in situ conversion of the ZnO nanoparticles into porous crystals of ZIF-8. (a, b) Adapted from Ref. [74]. (c, d) Adapted from Ref. [75] with permission from the American Chemical Society.

Table 3
Advantages and limitations of recent developments on automated SPE using flow techniques.

Automated SPE	Advantages	Limitations
3D printing	Reproducible fabrication of devices with complex structures	Limitations in the use of organic solvents as eluents
Magnetic sorbents	Simple column packing and renewal using a magnetic field	Limited number of commercial sorbents. Need of synthetic skills
Stirred sorbent extraction	Analysis of complex matrix samples	Longer extraction times are usually required
Extraction membranes/disks	High analyte mass transfer and extraction efficiency. Simple preparation	Less durable in comparison with polymer monoliths
Monolithic extraction	High analyte mass transfer and extraction efficiency	Overpressure at high flow rates

sorbents, will be beneficial to obtain 3D printed SPE devices coated with highly porous and selective nanomaterials. In addition, further work towards more robust 3D printable materials is also needed to improve certain SPE applications involving organic solvents. The use of pure organic solvents can compromise the long-term stability of the 3D printed device, creating potential interferences in the analytical determination due to polymer residues leaching from the device, which is especially relevant when using optical detection techniques.

- (ii) Recent developments on magnetic sorbents enabled the automation of flow-based SPE using nanostructured materials without packing, or clogging limitations. Automation of the magnetic sorbent loading into the flow network as well as the automated renewal of the sorbent, are two of the main points to be developed. The automated manipulation of dissolvable nanostructured magnetic sorbents could be worth of exploring to improve the preconcentration factors.
- (iii) Flow-batch reactors combined with flow techniques enabled the automation of the rotating disk and stir bar extraction techniques. Commercial and lab made coatings have been developed creating very simple and efficient stirred extraction supports using commercial sorbent disks, or epoxy composites. However, the hyphenation of such systems with separation techniques must be developed to fully benefit from these new modes of automated SPE.
- (iv) Membranes and disks are also interesting supports to develop automated SPE applications with a high efficiency and low pressure. Recently, new membrane/disks formats have been reported based on functional fibers and mixed-matrices containing micro/nanomaterials. We expect interesting developments by the fabrication of novel mixed-matrix membranes/disks based on advanced materials, such as ultraporous carbons or low-dimensional materials.
- (v) Strategies towards polymer monoliths and carbon sponges with higher surface area will be beneficial to further increase the performance of these supports for SPE applications. Their hyphenation with chromatographic techniques is still needed for the full automation of the developed analytical method.

Implementation of quality-assurance/quality-control systems will be required to evaluate the potential of these new developments in automated SPE for routine analysis of real samples. Another aspect to consider is the miniaturization of the extraction devices to minimize the use of reagents/solvent and waste generation, as part of the principles of green analytical chemistry (GAC) [77–79]. Decreasing the amount of the required sorbent, the improvement of the extraction efficiencies using smaller extraction devices, or the development of highly reusable extraction supports, will favor the principles of GAC. The use of 3D printing to develop analytical methods is also in accordance with the GAC principles,

minimizing the amount of waste produced in the fabrication of the extraction devices.

Acknowledgements

The Spanish Agencia Estatal de Investigación (AEI – Spain) and the European Funds for Regional Development (FEDER – European Union) are gratefully acknowledged for financial support through Project CTQ2016-77155-R (AEI/FEDER, UE). C. Calderilla acknowledges to the National Council of Science and Technology in Mexico (CONACYT) for the allowance of a grant. F. Maya thanks MINECO for a Juan de la Cierva – Incorporación Fellowship (IJCI-2015-24056).

References

- [1] F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollon, S.C.G.N. Braga, New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.012>.
- [2] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid phase extraction of organic compounds: a critical review (Part I), *Trends Anal. Chem.* 80 (2015) 1–42. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>.
- [3] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: a critical review (Part II), *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>.
- [4] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
- [5] H. Piri-Moghadam, F. Ahmadi, J. Pawliszyn, A critical review of solid phase microextraction for analysis of water samples, *Trends Anal. Chem.* 85 (2016) 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.029>.
- [6] J. Plotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Miniaturized solid-phase extraction techniques, *Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.026>.
- [7] B. Buszewski, M. Szultka, Past, present, and future of solid phase extraction: a review, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 42 (2012) 198–213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>.
- [8] H. Piri-Moghadam, M.N. Alam, J. Pawliszyn, Review of geometries and coating materials in solid phase microextraction: opportunities, limitations, and future perspectives, *Anal. Chim. Acta* 984 (2017) 42–65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.035>.
- [9] F. Maya, C.P. Cabello, M. Ghani, G.T. Palomino, V. Cerdà, Emerging materials for sample preparation, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 262–287. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700836>.
- [10] F. Ghaemi, A. Amiri, R. Yunus, Methods for coating solid-phase microextraction fibers with carbon nanotubes, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.011>.
- [11] N. Li, H.-L. Jiang, X. Wang, X. Wang, G. Xu, B. Zhang, L. Wang, R.-S. Zhao, J.-M. Lin, Recent advances in graphene-based magnetic composites for magnetic solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.01.009>.
- [12] P. Rocio-Bautista, P. González-Hernández, V. Pino, J. Pasán, A.M. Afonso, Metal-organic frameworks as novel sorbents in dispersive-based microextraction approaches, *Trends Anal. Chem.* 90 (2017) 114–134. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.002>.
- [13] F. Maya, C.P. Cabello, R.M. Frizzarin, J.M. Estela, G.T. Palomino, V. Cerdà, Magnetic solid-phase extraction using metal-organic frameworks (MOFs) and their derived carbons, *Trends Anal. Chem.* 90 (2017) 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.004>.
- [14] D.F. Hagen, C.G. Markell, G.A. Schmitt, D.D. Blevins, Membrane approach to solid-phase extractions, *Anal. Chim. Acta* 236 (1990) 157–164. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)83309-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)83309-7).
- [15] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R.M. Peña-Creciente, J. Otárola-Jiménez, Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: a review, *Anal. Chim. Acta* 892 (2015) 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.046>.

- [16] F. Svec, Less common applications of monoliths: preconcentration and solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B* 841 (2006) 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.055>.
- [17] N. Reyes-Garcés, E. Gionfriddo, G.A. Gómez-Ríos, M.N. Alam, E. Boyacı, B. Bojko, V. Singh, J. Grandy, J. Pawliszyn, Advances in solid phase microextraction and perspective on future directions, *Anal. Chem.* 90 (2018) 302–360. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04502>.
- [18] R. Jiang, J. Pawliszyn, Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 39 (2012) 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.005>.
- [19] M.M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS), *Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.003>.
- [20] I. Vasconcelos, C. Fernandes, Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices, *Trends Anal. Chem.* 89 (2017) 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.11.011>.
- [21] J.M.F. Nogueira, Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.002>.
- [22] M. Trojanowicz, K. Kolacinska, Recent advances in flow injection analysis, *Analyst* 141 (2016) 2085–2139. <https://doi.org/10.1039/C5AN02522B>.
- [23] V. Cerda, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerda, *Flow Analysis: a Practical Guide*, first ed., Elsevier Science, Netherlands, 2014. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-02414-3>.
- [24] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145–157. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)84761-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)84761-9).
- [25] J. Ruzicka, G.D. Marshall, Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329–343. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)83937-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)83937-9).
- [26] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, Multicommution in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests, *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 129–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)00090-5](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00090-5).
- [27] V. Cerda, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altamira, P. Sitjar, Flow techniques in water analysis, *Talanta* 50 (1999) 695–705. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00196-4).
- [28] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00514-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00514-7).
- [29] J. Ruzicka, Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection, *Analyst* 125 (2000) 1053–1060. <https://doi.org/10.1039/B001125H>.
- [30] A.N. Ramdzan, L. Barreiros, M.I.G.S. Almeida, S.D. Kolev, M.A. Segundo, Determination of salivary cotinine through solid phase extraction using a bead-injection lab-on-valve approach hyphenated to hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1429 (2016) 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.051>.
- [31] J. Avivar, L. Ferrer, M. Casas, V. Cerda, Fully automated lab-on-valve-multisyringe flow injection analysis-ICP-MS system: an effective tool for fast, sensitive and selective determination of thorium and uranium at environmental levels exploiting solid phase extraction, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 327–334. <https://doi.org/10.1039/C2JA10304D>.
- [32] M.A. Obando, J.M. Estela, V. Cerda, Multi-syringe chromatography (MSC) system for the on-line solid-phase extraction and determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in superficial water, groundwater and wastewater outlet samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.05.016>.
- [33] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerda, Interfacing on-line solid phase extraction with monolithic column multisyringe chromatography and chemiluminescence detection: an effective tool for fast, sensitive and selective determination of thiazide diuretics, *Talanta* 80 (2010) 1333–1340. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.033>.
- [34] A.D. Batista, P. Chochołouš, D. Šatinský, P. Solich, F.R.P. Rocha, On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography, *Talanta* 133 (2015) 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.056>.
- [35] A.I. Shalhan, P. Smejkal, M. Corban, R.M. Gijjt, M.C. Breadmore, Cost-effective three-dimensional printing of visibly transparent microchips within minutes, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3124–3130. <https://doi.org/10.1021/ac4041857>.
- [36] S. Waheed, J.M. Cabot, N.P. Macdonald, T. Lewis, R.M. Gijjt, B. Paull, M.C. Breadmore, 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers, *Lab Chip* 16 (2016) 1993–2013. <https://doi.org/10.1039/C6LC00284F>.
- [37] B. Gross, S.Y. Lockwood, D.M. Spence, Recent advances in analytical chemistry by 3D Printing, *Anal. Chem.* 89 (2017) 57–70. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04344>.
- [38] U. Kalsoom, P.N. Nesterenko, B. Paull, Current and future impact of 3D printing on the separation sciences, *Trends Anal. Chem.* 105 (2018) 492–502. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.006>.
- [39] C. Chen, B.T. Mehl, A.S. Munshi, A.D. Townsend, D.M. Spence, R.S. Martin, 3D-printed microfluidic devices: fabrication, advantages and limitations—a mini review, *Anal. Methods* 8 (2016) 6005–6012. <https://doi.org/10.1039/C6AY01671E>.
- [40] É.M. Kataoka, R.C. Murer, J.M. Santos, R.M. Carvalho, M.N. Eberlin, F. Augusto, R.J. Poppi, A.L. Gobbi, L.W. Hantao, Simple, Expendable, 3D-printed microfluidic systems for sample preparation of petroleum, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3460–3467. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04413>.
- [41] K.B. Anderson, S.Y. Lockwood, R.S. Martin, D.M. Spence, A 3D printed fluidic device that enables integrated features, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5622–5626. <https://doi.org/10.1021/ac4009594>.
- [42] C.K. Su, P.J. Peng, Y.C. Sun, Fully 3D-printed preconcentrator for selective extraction of trace elements in seawater, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6945–6950. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01599>.
- [43] E. Mattio, F. Robert-Peillard, C. Branger, K. Puzio, A. Margaillan, C. Brach-Papa, J. Knoery, J.-L. Boudenne, B. Coulomb, 3D-printed flow system for determination of lead in natural waters, *Talanta* 168 (2017) 298–302. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.059>.
- [44] C. Calderilla, F. Maya, V. Cerda, 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>.
- [45] C. Calderilla, F. Maya, V. Cerda, L.O. Leal, 3D printed device for the automated preconcentration and determination of chromium (VI), *Talanta* 184 (2018) 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.065>.
- [46] A. Apilux, W. Dungchai, W. Siangproh, N. Praphairaksit, C.S. Henry, O. Chailapakul, Lab-on-Paper with dual electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1727–1732. <https://doi.org/10.1021/ac9022555>.
- [47] E. Mattio, F. Robert-Peillard, L. Vassalo, C. Branger, A. Margaillan, C. Brach-Papa, J. Knoery, J.-L. Boudenne, B. Coulomb, 3D-printed lab-on-valve for fluorescent determination of cadmium and lead in water, *Talanta* 183 (2018) 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.051>.
- [48] H. Wang, D.J. Cocovi-Solberg, B. Hu, M. Miró, 3D-printed microflow injection analysis platform for online magnetic nanoparticle sorptive extraction of antimicrobials in biological specimens as a front end to liquid chromatographic assays, *Anal. Chem.* 89 (2017) 12541–12549. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03767>.
- [49] M.N. Costa, B. Veigas, J.M. Jacob, D.S. Santos, J. Gomes, P.V. Baptista, R. Martins, J. Inácio, E. Fortunato, A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper, *Nanotechnology* 25 (2014) 094006. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/9/094006>.
- [50] M. Granica, M. Fiedoruk-Pogrebniak, R. Koncki, Ł. Tymecki, Flow injection analysis in lab-on-paper format, *Sens. Actuators B Chem.* 257 (2018) 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.088>.
- [51] C.-K. Su, W.-C. Chen, 3D-printed, TiO₂ NP-incorporated minicolumn coupled with ICP-MS for speciation of inorganic arsenic and selenium in high-salt-content samples, *Microchim. Acta* 185 (2018) 268. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2812-8>.
- [52] M. Wierucka, M. Biziuk, Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.007>.
- [53] R.B. Dominguez, G.A. Alonso, R. Muñoz, A. Hayat, J.-L. Marty, Design of a novel magnetic particles based electrochemical biosensor for organophosphate insecticide detection in flow injection analysis, *Sens. Actuators B Chem.* 208 (2015) 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.069>.
- [54] C. Vakh, M. Alaboud, S. Lebedinet, D. Korolev, V. Postnov, L. Moskvina, O. Osmolovskaya, A. Bulatov, An automated magnetic dispersive micro-solid phase extraction in a fluidized reactor for the determination of fluoroquinolones in baby food samples, *Anal. Chim. Acta* 1001 (2018) 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.065>.
- [55] F. Maya, C.P. Cabello, J.M. Estela, V. Cerda, G.T. Palomino, Automatic in-syringe dispersive microsolid phase extraction using magnetic metal-organic frameworks, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7545–7549. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01993>.
- [56] A. González, J. Avivar, F. Maya, C.P. Cabello, G.T. Palomino, V. Cerda, In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbon microparticles obtained from zeolitic imidazolate frameworks, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 225–234. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9988-8>.
- [57] R.M. Frizzarin, C.P. Cabello, M.D.M. Bauzá, L.A. Portugal, F. Maya, V. Cerda, J.M. Estela, G.T. Palomino, Submicrometric magnetic nanoporous carbons derived from metal-organic frameworks enabling automated electromagnet-assisted online solid-phase extraction, *Anal. Chem.* 88 (2016) 6990–6995. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02065>.
- [58] I.S. Barreto, S.I.E. Andrade, F.A.S. Cunha, M.B. Lima, M.C.U. Araujo, L.F. Almeida, A robotic magnetic nanoparticle solid phase extraction system coupled to flow-batch analyzer and GFAAS for determination of trace cadmium in edible oils without external pretreatment, *Talanta* 178 (2018) 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.063>.
- [59] D.A.V. Medina, Á.J. Santos-Neto, V. Cerda, F. Maya, Automated dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of the organic phase, *Talanta* 189 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.081>.
- [60] Y. Chao, X. Zhang, L. Liu, L. Tian, M. Pei, W. Cao, Determination of hydroquinone by flow injection chemiluminescence and using magnetic surface molecularly imprinted particles, *Microchim. Acta* 182 (2015) 943–948. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1415-2>.
- [61] H. Wu, N. Gao, L. Zhang, Y. Li, Y. Shi, L. Du, Automated magnetic solid-phase extraction for synthetic food colorant determination, *Food Anal. Meth.* 9 (2016) 614–623. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0219-2>.

- [62] M.C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Stir membrane extraction: a useful approach for liquid sample pretreatment, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8957–8961. <https://doi.org/10.1021/ac9016192>.
- [63] V. Manzo, M. Miró, P. Richter, Programmable flow-based dynamic sorptive microextraction exploiting an octadecyl chemically modified rotating disk extraction system for the determination of acidic drugs in urine, *J. Chromatogr. A* 1368 (2014) 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.079>.
- [64] M. Ghani, M. Saraji, F. Maya, V. Cerdà, Automated multisyringe stir bar sorptive extraction using robust montmorillonite/epoxy-coated stir bars, *J. Chromatogr. A* 1445 (2016) 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.081>.
- [65] C. Pons, R. Forteza, V. Cerdà, The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples, *Talanta* 66 (2005) 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.11.009>.
- [66] A. Anthemidis, V. Kazantzi, V. Samanidou, A. Kabir, K.G. Furton, An automated flow injection system for metal determination by flame atomic absorption spectrometry involving on-line fabric disk sorptive extraction technique, *Talanta* 156–157 (2016) 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.012>.
- [67] M. Ghani, M.F.F. Picó, S. Salehinia, C.P. Cabello, F. Maya, G. Berlier, M. Saraji, V. Cerdà, G.T. Palomino, Metal-organic framework mixed-matrix disks: versatile supports for automated solid-phase extraction prior to chromatographic separation, *J. Chromatogr. A* 1488 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.069>.
- [68] C.P. Cabello, M.F.F. Picó, F. Maya, M. del Rio, G.T. Palomino, UiO-66 derived etched carbon/polymer membranes: high-performance supports for the extraction of organic pollutants from water, *Chem. Eng. J.* 346 (2018) 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.019>.
- [69] M. Ghani, C.P. Cabello, M. Saraji, J.M. Estela, V. Cerdà, G.T. Palomino, F. Maya, Automated solid-phase extraction of phenolic acids using layered double hydroxide–alumina–polymer disks, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 2012–2019. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701420>.
- [70] J.C. Masini, F. Svec, Porous monoliths for on-line sample preparation: a review, *Anal. Chim. Acta* 964 (2017) 24–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.002>.
- [71] P. Chocholous, P. Solich, D. Šatínský, An overview of sequential injection chromatography, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.02.018>.
- [72] J.C. Masini, Separation of proteins by cation-exchange sequential injection chromatography using a polymeric monolithic column, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 1445–1452. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9242-9>.
- [73] L.F. Ribeiro, J.C. Masini, Complexing porous polymer monoliths for online solid-phase extraction of metals in sequential injection analysis with electrochemical detection, *Talanta* 185 (2018) 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.099>.
- [74] M. Ghani, F. Maya, V. Cerdà, Automated solid-phase extraction of organic pollutants using melamine-formaldehyde polymer-derived carbon foams, *RSC Adv.* 6 (2016) 48558–48565. <https://doi.org/10.1039/C6RA08230K>.
- [75] M.M. Darder, S. Salehinia, J.B. Parra, J.M. Herrero-Martinez, F. Svec, V. Cerdà, G.T. Palomino, F. Maya, Nanoparticle-directed metal–organic framework/porous organic polymer monolithic supports for flow-based applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 1728–1736. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b10999>.
- [76] M. Serrano, M. Bartolomé, J.C. Bravo, G. Paniagua, J. Gañan, A. Gallego-Picó, R.M. Garcinuño, On-line flow injection molecularly imprinted solid phase extraction for the preconcentration and determination of 1-hydroxypyrene in urine samples, *Talanta* 166 (2017) 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.048>.
- [77] M. Farré, S. Pérez, C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, D. Barceló, Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1347–1362. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.016>.
- [78] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices, *Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [79] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.011>.

20th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques

2nd - 7th October, 2016
Palma de Mallorca
Spain



The Organizing Committee certify that:

Carlos M. Calderilla

has attended the **20th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques** held at the Hotel Barcelo Pueblo Park (Palma de Mallorca, Spain), from October 2nd to 7th, 2016. For the records, we sign this certificate on the date and place mentioned above.

Fernando Maya

Organizing Secretariat

Palma de Mallorca, 2nd October 2016



Universitat
de les Illes Balears





ST PETERSBURG STATE UNIVERSITY

CERTIFICATE

This is to certify that

Carlos Calderilla

has successfully participated in the 21st
International Conference on Flow Injection Analysis
and Related Techniques with the Poster
Presentation

«3D printed extraction device with integrated
features for the automated determination of
chromium (VI)»

Chairman, Organizing Committee
of the 21st ICFA
Dr. Sci, Prof. Andrey Bulatov





ST PETERSBURG STATE UNIVERSITY

CERTIFICATE

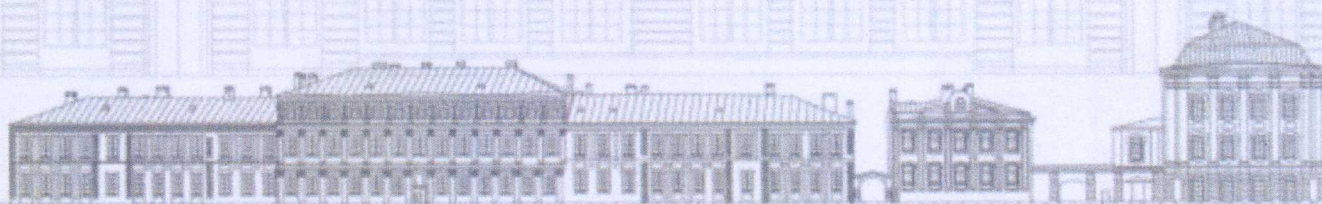
This is to certify that

Carlos Calderilla

has successfully participated in the 21st
International Conference on Flow Injection Analysis
and Related Techniques with the Poster
Presentation

«3D printed integrated device for disk-based
automated solid-phase extraction»

Chairman, Organizing Committee
of the 21st ICFA
Dr. Sci, Prof. Andrey Bulatov



Certificado

El Grupo 9 de Universidades (G-9), CIF G31729775, certifica que

CARLOS MAURICIO CALDERILLA JAIME

NIF/NIE: G16347621

Ha participado en las VI Jornadas Doctorales G-9 que, organizadas por la Universidad de Cantabria, se han celebrado en Santander los días 11, 12 y 13 de abril de 2018 presentando el póster Dispositivos impresos 3D para la extracción basada en disco para la determinación espectrofotométrica de metales.

El Grupo 9 de Universidades (G-9) es una asociación integrada por las universidades españolas que son las únicas de carácter público en sus respectivas Comunidades Autónomas: Universidad de Cantabria, Universidad de Castilla-La Mancha, Universidad de Extremadura, Universitat de les Illes Balears, Universidad de La Rioja, Universidad de Oviedo, Universidad del País Vasco, Universidad Pública de Navarra y Universidad de Zaragoza.

Para que conste, se expide el presente certificado, en Pamplona, a 02 de mayo de 2018

Código de verificación electrónica: e8f57dce005956c755546d5c28cd103e Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección http://www.uni-g9.net/validarDiploma.php	
Firmante:	Grupo 9 Universidades
Fecha y hora:	2018-05-02 08:36:38