



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IMPRESO EN 3D PARA LA EXTRACCIÓN DE SULFONAMIDAS Y SU POSTERIOR DETERMINACIÓN MEDIANTE HPLC- DAD

Mónica Pareja Centeno

Grado de Química

Facultad de Ciencias

Año Académico 2021-22

DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO IMPRESO EN 3D PARA LA EXTRACCIÓN DE SULFONAMIDAS Y SU POSTERIOR DETERMINACIÓN MEDIANTE HPLC-DAD

Mónica Pareja Centeno

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2021-22

Palabras clave del trabajo:

Impresión 3D, sulfonamidas, extracción en fase sólida, HPLC-DAD

Tutora del Trabajo: Laura Ferrer Trovato

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resumen

En los últimos años, se ha generado una creciente preocupación respecto a la contaminación producida por contaminantes emergentes. Entre ellos, destacan especialmente en el grupo de los fármacos, los antibióticos, cuyo uso indiscriminado ha provocado la aparición de cepas de bacterias súper-resistentes a antibióticos específicos como las sulfonamidas. En este contexto, este trabajo de fin de grado (TFG) propone el diseño, fabricación, optimización y aplicación de un dispositivo impreso en 3D para la extracción de sulfonamidas y su posterior determinación mediante HPLC-DAD.

Para ello se ha diseñado un dispositivo cúbico, compuesto por tetraedros intercalados formando canales internos que le proporcionan una elevada relación superficie- volumen que funciona como soporte para una resina de extracción en fase sólida. El dispositivo se ha impreso mediante estereolitografía (SLA) y recubierto con una resina de extracción en fase sólida (Oasis MCX), empleando una técnica de impregnación previa al curado (Stick and cure).

Se llevaron a cabo ensayos para optimizar la extracción de sulfonamidas, considerando las variables (i) tipo de eluyente, (ii) volumen de eluyente y (iii) tiempo de retención. Como resultado se utilizaron 5 ml de una disolución de metanol:hidróxido de amonio (95:5 v/v) y 30 min de extracción bajo agitación. Bajo estas condiciones óptimas se han extraído con el dispositivo 3D recubierto, y separado y detectado mediante HPLC-DAD, siete sulfonamidas: sulfanilamida, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfametoxazol y sulfadimetoxina.

También se han obtenido curvas de calibrado para cada sulfonamida empleando el dispositivo desarrollado, todas con un buen ajuste ($R^2 > 0,993$). A continuación, se han llevado a cabo una serie de extracciones de estas sulfonamidas a distintas concentraciones obteniendo hasta un 72% de extracción, un factor de enriquecimiento de hasta 7 veces, unos límites de detección entre 4 y 21 ppb y unos límites de cuantificación entre 31 y 70 ppb.

Resum

En els últims anys, s'ha generat una creixent preocupació respecte a la contaminació produïda per contaminants emergents. Entre ells, destaquen especialment en el grup dels fàrmacs, els antibiòtics, l'ús indiscriminat dels quals ha provocat l'aparició de ceps de bacteris súper-resistents a antibiòtics específics com les sulfonamides. En aquest context, aquest treball de fi de grau (TFG) proposa el disseny, fabricació, optimització i aplicació d'un dispositiu imprès

en 3D per a l'extracció de sulfonamides i la seva posterior determinació mitjançant HPLC-DAD.

Per a això s'ha dissenyat un dispositiu cúbic, compost per tetraedres intercalats formant canals interns que li proporcionen una elevada relació superfície – volum que funciona com a suport per a una resina d'extracció en fase sòlida. El dispositiu s'ha imprès mitjançant estereolitografia (SLA) recobert amb resina Oasis MCX, emprant una tècnica de post-curat (Stick and cure).

Es van dur a terme assajos per a optimitzar l'extracció de sulfonamides, considerant les variables (i) tipus de eluent, (ii) volum de eluent i (iii) temps de retenció. Com a resultat es van utilitzar 5 ml d'una dissolució de metanol:hidròxid d'amoni (95:5 v/v) i 30 min d'extracció sota agitació. Sota aquestes condicions òptimes s'han extret amb el dispositiu 3D recobert, separat i detectat mitjançant HPLC-DAS, set sulfonamides: sulfanilamida, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfametoxazol i sulfadimetoxina.

També s'han obtingut corbes de calibrat per cada sulfonamide empleant el dispositiu desenvolupat, totes amb un bon ajust ($R^2 > 0,993$). A continuació, s'han dut a terme una sèrie d'extraccions d'aquestes sulfonamides a diferents concentracions obtenint fins a un 72% d'extracció, un factor d'enriquiment de fins a 7 vegades, uns LOD entre 4 i 21 ppb i uns LOQ entre 31 i 70 ppb.

Abstract

In recent years, there has been growing concern about pollution caused by emerging pollutants. Among them, they are particularly prominent in the group of drugs, antibiotics, whose indiscriminate use has led to the emergence of strains of super-resistant bacteria to specific antibiotics such as sulfonamides. In this context, this Degree Final Project proposes the design, manufacture, optimization, and application of a 3D printed device for the extraction of sulfonamides and their subsequent determination using HPLC-DAD.

For this a cubic device, formed by tetrahedra intercalated to form internal channels that provide a high surface – volume ratio, has been designed to work as a support for a solid phase extraction resin. The device has been printed using stereolithography (SLA) and functionalized with resin Oasis MCX, using the stick and cure technique.

Several assays were carried out to optimize the sulfonamide extraction, considering the variables (i) eluent type, (ii) eluent volume and (iii) retention time. As a result, 5 ml of a methanol: ammonium hydroxide solution, (95:5 V/V) and 30 min of extraction under agitation were used. Under these optimal conditions, seven sulfonamides: sulfanilamide, sulfadiazine,

sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxypyridazine, sulfamethoxazole, and sulfadimethoxine have been extracted using the functionalized 3D device and separated and detected by HPLC-DAD.

Calibration curves for each sulfonamide using the device developed were obtained with a good fit ($R^2 > 0.993$). Then, several extraction assays were performed at different concentrations reaching up to 72% extraction efficiency, an enrichment factor of up to 7 times, detection limits between 4 and 21 ppb, and quantification limits between 31 and 70 ppb.

Agradecimientos

En este trabajo de fin de grado, que marca el final de mi etapa como estudiante de Química en la UIB, quiero agradecer a papá y a mamá, por estar a mi lado en cada paso del camino; a mi tutora, Laura Ferrer, por ayudarme a reencontrar la pasión por la Química y permitirme echar un vistazo al mundo de la investigación y a Diego Barzallo, el doctorando con quien he tenido el placer de compartir proyecto, por su paciencia, por las risas y por enseñarme a lidiar con la frustración. Sin vosotros no hubiera llegado hasta aquí.

Por último, quiero destacar que este trabajo de fin de grado es parte del proyecto de I+D+i “Materiales y tecnologías de fabricación avanzadas para la monitorización y eliminación de contaminantes emergentes en aguas: hacia una economía circular del agua (CE3DMAT)” Ref. PID2019-107604RB-I00, Referencia del proyecto/ayuda, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/.

Índice

1. Introducción	7
1.1. Contaminantes emergentes	7
1.2. Tecnología de impresión 3D en Química Analítica	10
1.3. Otras técnicas utilizadas.....	11
2. Objetivo	14
3. Materiales y métodos	14
3.1. Reactivos y material de laboratorio	14
3.2. Diseño e impresión 3D.....	15
3.3. Recubrimiento del dispositivo	16
3.4. Ensayos preliminares de extracción.....	16
3.5. Ensayo para seleccionar la resina de SPE	18
3.6. Optimización de los parámetros de extracción de sulfonamidas.....	18
3.7. Curvas de calibrado y parámetros analíticos	19
4. Resultados y discusión	20
4.1. Diseños y selección del dispositivo 3D	20
4.2. Selección de la resina de extracción	22
4.3. Optimización.....	24
4.4. Curvas de calibrado	26
4.5. Parámetros analíticos	31
5. Conclusiones	32
6. Bibliografía.....	33

1. Introducción

1.1. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes (CE) son un conjunto de compuestos, generalmente orgánicos, cuya presencia y consecuencias en el medio ambiente han pasado inadvertidas durante un período largo de tiempo, debido a las bajas concentraciones en que se encuentran, pero que, en la actualidad, generan una gran preocupación ambiental, debido a la liberación descontrolada (sin regulación) que se ha llevado a cabo durante los últimos años.¹

Hoy en día, se conocen distintos grupos de CE, los cuales son considerados compuestos perjudiciales no solo para el medio ambiente, sino para la salud humana, puesto que pueden causar toxicidad crónica, disrupción endocrina o cáncer. Entre ellos, cabe destacar: retardantes de llama bromados, parafinas cloradas, pesticidas polares, compuestos perfluorados, fármacos, productos de higiene personal, y drogas recreativas, entre otros.²

Una problemática asociada a este tipo de contaminantes es la dificultad para llevar a cabo su determinación en el medioambiente, debido a la baja concentración en la que se encuentran, en el rango de ppm a ppb, lo que implica hacer una extracción y preconcentración.

En general, los CE se liberan a través de aguas residuales de tipo doméstico e industrial, de actividades agrícolas y ganaderas, mediante efluentes hospitalarios, y por descarga directa al medio, formando parte de lo que se conoce como “ciclo del agua” (Figura 1).¹

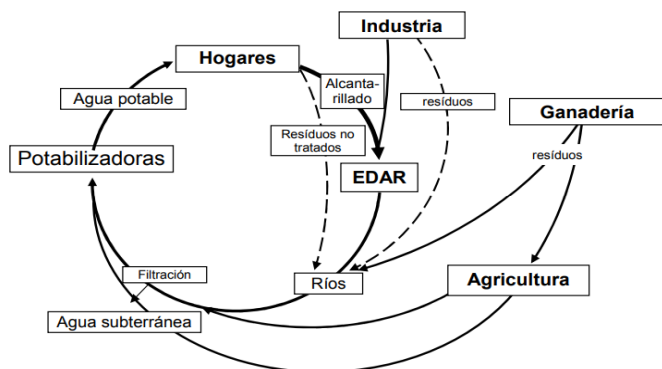


Figura 1: Ciclo del agua mediante el que se propagan los contaminantes emergentes.¹

Aunque los CE no están regulados por ningún tipo de normativa, en el caso de la Unión Europea se dispone de una lista de sustancias bajo vigilancia y se llevan a cabo estudios con el objetivo de definir su efecto y encontrar cuál es el límite razonable de los mismos en vertidos y en estudios de calidad de aguas.³

Entre los diversos tipos de CE existentes, los fármacos, y especialmente los antibióticos, generan una gran preocupación, debido a su elevado consumo tanto en medicina humana como veterinaria. Además del aumento en el consumo de antibióticos, el hecho de que la mayoría de éstos no se degradan completamente durante el proceso metabólico, provoca que lleguen a las aguas residuales domésticas, concentraciones del fármaco “puro” y de sus metabolitos. Esto no sería un problema si mediante el tratamiento convencional de aguas residuales pudieran eliminarse completamente, pero dado que las plantas de tratamiento no están diseñadas para ello, estos compuestos acaban siendo descargados al medio ambiente, ya sea por directamente por emisarios o por el uso posterior del agua regenerada para riego de jardines o en agricultura.

En este contexto, las plantas de tratamiento actúan como vía de entrada de estas sustancias a masas de agua (ríos, lagos, o incluso el mar), que además pueden afectar a los suelos, y alcanzar aguas subterráneas contaminando los acuíferos. A largo plazo, los vertidos de antibióticos pueden producir fenómenos como el de las bacterias super-resistentes.²

Un estudio reciente que cataloga el río Manzanares como “el más contaminado por fármacos de Europa”⁵, destaca entre los contaminantes encontrados al sulfametoxazol. Además, esta sulfonamida se ha encontrado en todos los ríos analizados en ese estudio, en un rango de concentración similar al del paracetamol o la cafeína, llegando en algunos casos a concentraciones de hasta 100-150 µg/L.⁶

En cuanto a estructura se refiere, las sulfonamidas son moléculas compuestas por un átomo de azufre, unido mediante dobles enlaces a dos átomos de oxígeno y mediante enlace simple a un grupo amino y a un sustituyente generalmente aromático (Figura 2).

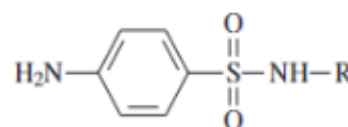


Figura 2: Estructura general de las sulfonamidas.

En cuanto a sus propiedades, son sustancias prácticamente insolubles en agua, con propiedades anfóteras, debido a la presencia del grupo amino presente en uno de los sustituyentes y del grupo amida, que contiene un hidrógeno lábil con propiedades ácidas. Cabe destacar que estas sustancias tienen carga positiva a pH<2, neutra a pH 3-5 y negativa a pH>5. Las sulfonamidas más utilizadas y, por lo tanto, las presentes en el medio acuático son la sulfanilamida, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, el sulfametoxazol y la sulfadimetoxina (Figura 3).

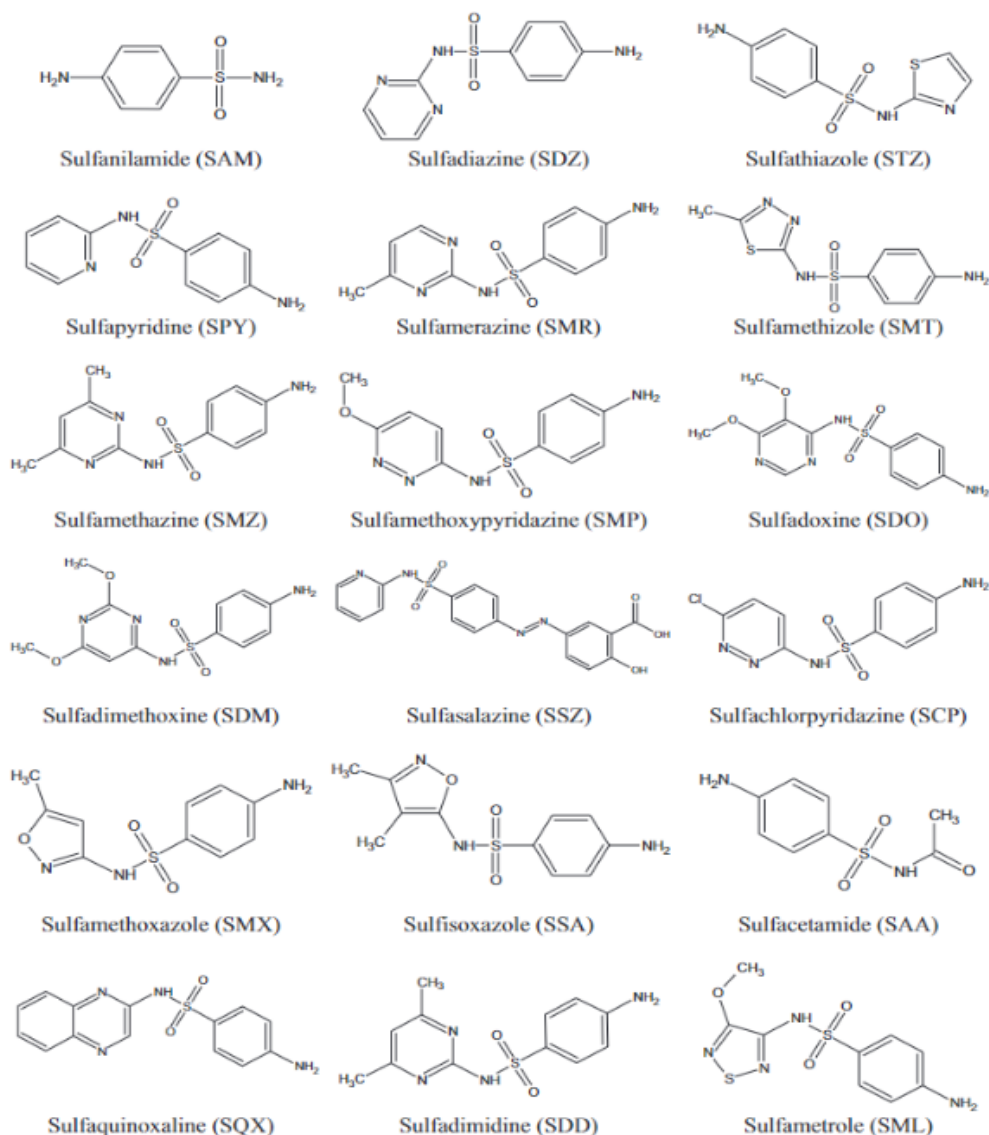


Figura 3: Estructura de las sulfonamidas más relevantes.

Por lo expuesto, es evidente que existe una gran variedad de sulfonamidas que pueden considerarse problemáticas y que es necesario controlar para evitar un mayor deterioro del medio ambiente. Es por esto, que en este trabajo de fin de grado (TFG) se desarrolla un dispositivo impreso en 3D recubierto por una resina de extracción en fase sólida que permita extraer de forma simultánea 7 sulfonamidas para su posterior separación y detección mediante HPLC-DAD.

1.2. Tecnología de impresión 3D en Química Analítica

Debido a la baja concentración en la que se encuentran las sulfonamidas en el medio ambiente, la extracción y preconcentración de las mismas es un requerimiento metodológico para alcanzar su detección. Es por este motivo que constantemente se están investigando alternativas a las técnicas convencionales que permitan el desarrollo de métodos cada vez más eficaces. Es aquí donde entra en juego la impresión 3D, una nueva herramienta mediante la que pueden diseñarse y fabricarse todo tipo de objetos, que pueden contribuir a facilitar el análisis.

La impresión 3D es una técnica que consiste en crear un objeto tridimensional en base a un modelo digital, diseñado previamente, mediante la deposición por capas de distintos materiales, haciendo uso de una impresora 3D. De esta forma, el proceso de creación comienza con el diseño de la pieza a imprimir, utilizando un software de impresión 3D adecuado. A continuación, se transfiere el diseño a la impresora y se lleva a cabo la impresión.

La impresión 3D se origina en 1977, de la mano de W. K. Swainson que patentó el "uso de un láser para crear enlaces cruzados covalentes en la superficie de un monómero líquido".⁷ En base a esta idea, en 1981, H. Kodama utilizó láseres y disoluciones líquidas fotopoliméricas para crear objetos tridimensionales, dando lugar a lo que conocemos hoy en día como impresión estereolitográfica (SLA)", que es la modalidad de impresión que se ha usado en este trabajo.

La técnica de impresión SLA se basa en la fotopolimerización de resinas fotocurables. En este caso, las impresoras están formadas por un tanque, en que se deposita la resina líquida, una plataforma de impresión móvil en el eje vertical y una fuente de luz UV, generalmente un láser, que se proyecta en la placa de impresión con la forma deseada y endurece la resina en el punto irradiado, generando la capa correspondiente al diseño digital que se está imprimiendo (Figura 4).

De los diversos tipos de impresión 3D existentes, la SLA es la opción más idónea para el desarrollo de dispositivos que precisan una resolución muy elevada, y es por eso por lo que se utilizó esta tecnología en el desarrollo del dispositivo descrito en este trabajo.

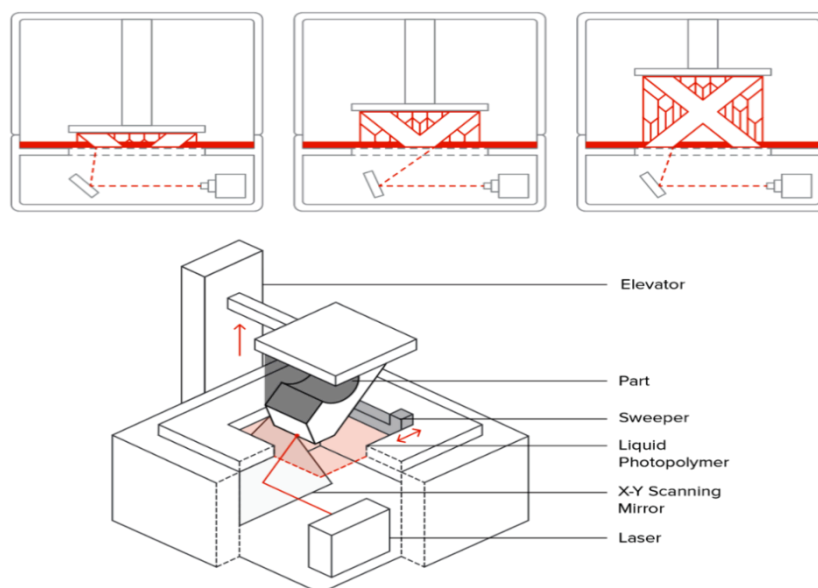


Figura 4: Proceso de impresión en SLA. Fuente: 3D Hubs

En cuanto a las aplicaciones en Química Analítica, actualmente se hace uso de la impresión 3D en diversos ámbitos, desde la generación de lechos cromatográficos variando la geometría de las partículas, su tamaño y el empaquetamiento en la columna, hasta la creación de prototipos de dispositivos para llevar a cabo extracciones de forma más eficiente, pasando por circuitos electrónicos y deposición de materiales metálicos para su aplicación en electroquímica.⁷

1.3. Otras técnicas utilizadas

Para llevar a cabo este trabajo de fin de grado se utilizaron técnicas de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD, por sus siglas en inglés) y microscopia de barrido electrónico (SEM, por sus siglas en inglés).

La SPE es una técnica diseñada para extraer selectivamente los analitos de interés, eliminando la matriz de la muestra. En la SPE, se aíslan los analitos de una muestra líquida mediante su adsorción a una fase estacionaria sólida, que luego son eluidos. Los eluatos que contienen a los analitos de interés, y presentan una matriz más sencilla, son luego analizados.

Los pasos a seguir para llevar a cabo una SPE son:

- 1- Acondicionamiento: Se lleva a cabo un pretratamiento de la resina, pasando por ella los disolventes que activen a los grupos funcionales que se encargarán de retener a los analitos de interés.
- 2- Extracción: se hace pasar la muestra, a las condiciones óptimas de pH, flujo, presión, etc., a través de la fase estacionaria con la intención de separar los analitos de la matriz, reteniéndolos.
- 3- Lavado: Para eliminar la mayor cantidad de impurezas posibles, antes de llevar a cabo la elución, se pasa por la resina algún disolvente que desplace el resto de las sustancias que no interesan y solo quede retenido en la resina el analito de interés.

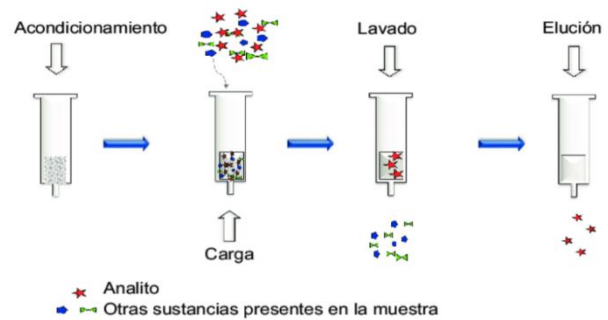


Figura 5: Proceso de extracción mediante la SPE.

- 4- Elución: Por último, se eluyen los analitos con un disolvente adecuado que permita dejar a los analitos de interés en disolución, y de ser posible, pueda ser introducido directamente en el instrumento para su análisis.

La HPLC permite separar los componentes de una mezcla mediante la retención de los mismos a distintos tiempos en una fase estacionaria, y que son transportados por una fase móvil mediante el uso de una bomba de alta presión. La fase móvil tiene un papel de extrema importancia en los procesos de separación, ya que el tiempo de retención de un analito está estrechamente ligado a su afinidad tanto con la fase móvil como con la fase estacionaria.

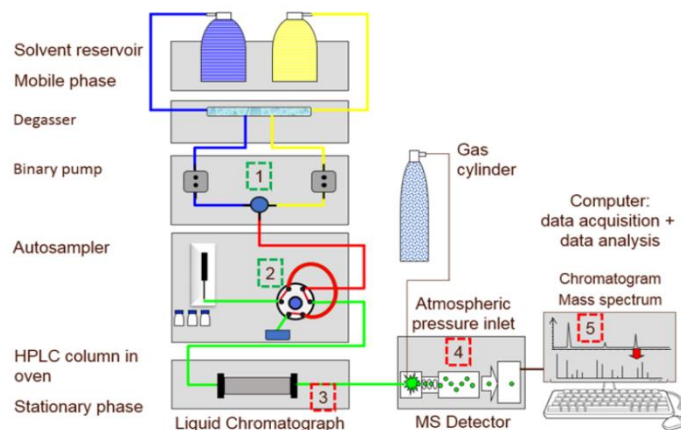


Figura 6: Diagrama del funcionamiento del equipo HPLC en cromatografía líquida.

Para llevar a cabo el análisis, se inyecta un pequeño volumen de muestra mediante un bucle de carga de una válvula de inyección, en el flujo de la fase móvil, iniciando así el ciclo cromatográfico. Una vez inyectada la muestra, la fase móvil se bombea a través de la columna empacada con una fase estacionaria, de forma que los compuestos que presentan mayor afinidad con la fase móvil migran rápidamente a través de la columna prácticamente sin interactuar, mientras que los compuestos con mayor afinidad con la fase estacionaria quedan brevemente retenidos, dando lugar a la separación. Al pasar por el detector, se produce una respuesta proporcional a la concentración de cada componente, en función al tiempo de retención (Figura 6). De esta manera, los tiempos de retención son característicos de cada compuesto y proporcionan un parámetro de identificación adecuado mediante la comparación con disoluciones patrón de concentración conocida, para la cuantificación de los compuestos deseados.

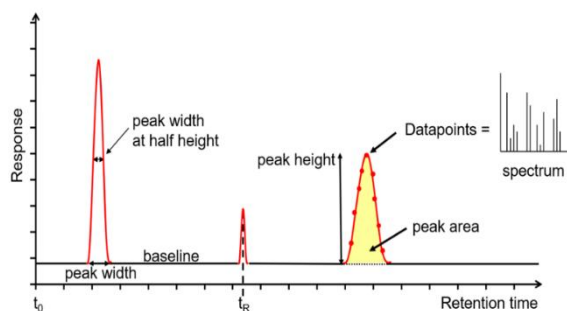


Figura 7: Ejemplo de un espectro obtenido mediante HPLC.

La información se recopila en cromatogramas como el representado en la Figura 7. El punto más alto del pico indica el tiempo de retención mientras que el área del pico indica la concentración del analito en la muestra. De esta forma, se identifican los analitos en base a la altura y se cuantifican en base a la anchura.

En este caso, el detector utilizado es un detector de arreglo de diodos (DAD). La base de su funcionamiento consiste en que el haz de radiación que atraviesa la celda de detección, colocada a la salida de la columna cromatográfica, se dispersa mediante una red de difracción fija siendo recogida simultáneamente mediante una matriz de fotodiodos. Utilizan una óptica invertida, de forma que toda la luz proveniente de la fuente atraviesa la muestra y luego es dispersada hacia la matriz de diodos dispuesta en forma de capas.

En cuanto al microscopio de barrido electrónico (SEM), se utiliza para obtener imágenes superficiales de una muestra para su caracterización morfológica.

Es una técnica basada en la emisión de un haz de electrones sobre la superficie de una muestra, en la que se registran las señales producidas por electrones secundarios causados por el choque del haz de emisión con la muestra, por electrones transmitidos que hayan atravesado la muestra y por radiación X, para formar una imagen clara de la superficie de la muestra a analizar (Figura 8).⁸

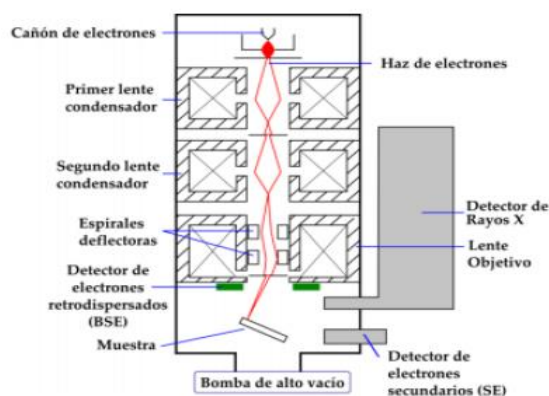


Figura 8: Diagrama de un microscopio de barrido electrónico.

2. Objetivo

El objetivo principal de este TFG es llevar a cabo el diseño, la fabricación, el recubrimiento y la optimización de un dispositivo impreso en 3D que permita la extracción de sulfonamidas, para su posterior separación y detección mediante HPLC-DAD.

Para llevar a cabo este objetivo general, se marcaron los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar y fabricar un dispositivo 3D que funcione como soporte para resinas de SPE.
- Revestir el dispositivo 3D con distintas resinas de SPE con la intención de determinar cuál es más adecuada para la extracción de sulfonamidas.
- Determinar los porcentajes de extracción y el factor de enriquecimiento obtenidos mediante el proceso de SPE utilizando el dispositivo 3D recubierto.
- Establecer algunos parámetros analíticos como el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para la determinación de sulfonamidas.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos y material de laboratorio

- Metanol (MeOH) – Scharlab (Barcelona, España), 99,9%
- Acetonitrilo (ACN) - Scharlab (Barcelona, España), 99,8%
- Hidróxido de amonio (NH₄OH) - Scharlab (Barcelona, España), 28%
- Ácido fórmico - Scharlab (Barcelona, España), 98%
- Isopropanol - Scharlab (Barcelona, España), 99,8%

- Patrones: Sulfanilamida (SAM) - Scharlab (Barcelona, España), 99,9% Sulfadiazina (SDZ), Sulfamerazina (SMR), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxipiridazina (SMP), Sulfametoxazol (SMX), Sulfadimetoxina (SDX) – Sigma Aldrich (St. Louis, USA).
- Resinas de SPE Oasis HLB y Oasis MCX – Waters (Barcelona, España)
- Jeringas de plástico de 5 ml de capacidad – Braun (Alemania)
- Filtros de nylon de 0,45µm de tamaño de poro – Branchia (España)
- Tubos de plástico con tapa de rosca, de 50 ml de capacidad
- Viales, taponos y septums.
- Agua Milli-Q (obtenida de un equipo Direct 8, Merck, España)

3.2. Diseño e impresión 3D

Para diseñar el dispositivo impreso en 3D que servirá de soporte a la resina de SPE, se utilizó el programa Rhinoceros 5 SR11 64 (McNeel and Associates, USA), que permite la modelización en 3D basado en NURBS (*Non-uniform rational B-spline*), un modelo matemático muy extendido en la generación de curvas y superficies mediante computación gráfica.⁹

Una vez diseñada la pieza en cuestión, el archivo debe guardarse en formato “.stl” para que pueda ser leído por el software PreForm (FormLabs) que se usa tanto para colocar las columnas que soportan a las piezas durante la impresión 3D, como para la impresión del dispositivo, ya que permite cargar los diseños y controlar los parámetros de impresión como la resolución o el tiempo de impresión, entre otros.

Durante la fase de experimentación del TFG se utilizaron dos impresoras 3D SLA, la Form 2 y la Form 3 (Formlabs), utilizando la resina de impresión Clear V4 (Formlabs), que es una resina fotopolimerizable líquida e incolora formada por monómeros y oligómeros acrílicos.¹⁰

Una vez impreso el dispositivo, se llevó a cabo el proceso de curado para alcanzar la fotopolimerización total del dispositivo. Para ello, cada dispositivo se mantiene durante 6 h en un reactor *CL-1000 Ultraviolet Crosslinker* expuesto a luz UV a una longitud de onda de 365 nm. Para recubrir los dispositivos con la resina de SPE, el fotocurado se lleva a cabo una vez que éste se ha impregnado de resina.

3.3. Recubrimiento del dispositivo

Una vez diseñado e impreso el dispositivo elegido, se retira de la placa de impresión y se enjuaga con isopropanol para eliminar la resina que no ha fotopolimerizado. A continuación, se seca con nitrógeno gas hasta eliminar cualquier resto de isopropanol. La superficie del dispositivo queda preparada para llevar a cabo su recubrimiento (con una textura adherente).

Se han utilizado dos resinas comerciales para la extracción en fase sólida: Oasis HLB y Oasis MCX. La primera es un polímero hidrofílico, humectable con agua que mantiene una retención y capacidad elevada incluso si se da un proceso de secado posterior al acondicionamiento. Además, es de fase reversa, ideal para todo tipo de analitos, sean ácidos, básicos o neutros. La segunda resina, se trata de un polímero de modo mixto e intercambio catiónico fuerte, también humectable con agua. Es selectivo para bases y es estable en eluyentes orgánicos, aspecto que también la hace ideal para ser utilizada en la extracción de sulfonamidas.¹¹

Para llevar a cabo el recubrimiento del dispositivo, éste se pone en contacto con una pequeña cantidad de resina de SPE en un tubo de plástico con tapa de rosca. A continuación, se agita manualmente (aprox. 1 min) hasta observar que la pieza ha quedado totalmente recubierta. Generalmente, gracias a la capacidad de impresión de las impresoras 3D utilizadas se imprimen varios dispositivos a la vez, y también se pueden recubrir varios dispositivos cada vez. De esta forma, con 500 mg de resina SPE pueden recubrirse hasta 15 dispositivos.

Una vez se ha impregnado cada dispositivo con la resina de SPE, se lleva a cabo el proceso de curado durante 6 h, como se explica en el apartado anterior. De esta forma, termina el proceso de recubrimiento conocido como "*Stick and Cure*".

En los ensayos que utilizan agitación magnética del dispositivo, a cada uno se agrega cuidadosamente de forma manual una grapa metálica entre los canales.

3.4. Ensayos preliminares de extracción

Una vez se ha diseñado, imprimido y recubierto el dispositivo 3D, se llevaron a cabo ensayos preliminares para determinar la capacidad de extracción de sulfonamidas o si debe llevarse a cabo un nuevo diseño que mejore el anterior.

En primer lugar, se realizó una curva de calibrado de disoluciones estándar de sulfametoxazol (SMX), sin extracción previa, mediante HPLC para establecer el tiempo de retención del analito de interés y el área del pico correspondiente al mismo para cada concentración.

Las disoluciones estándar para la curva de calibrado se prepararon de la siguiente forma:

- Se preparó una disolución madre (100 ml) de 500 ppm de SMX en metanol.
- A partir de la disolución madre, se preparó una disolución intermedia (50 ml) de 10 ppm en ACN:H₂O (10:90 v/v).
- A partir de la disolución intermedia, se preparó una disolución (50 ml) de 2 ppm en agua Milli-Q. Esta disolución constituye el punto de mayor concentración de la recta de calibrado (más tarde se amplió la recta hasta 30 ppm para estudiar el rango lineal del método).
- El resto de las disoluciones patrón (0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1 y 2 ppm) que forman parte de la recta de calibrado, fueron preparadas a partir de la disolución de 2 ppm en agua Milli-Q.

Para llevar a cabo el análisis, se utilizó un equipo HPLC JASCO LC-4000 con un método de elución isocrático con una fase móvil de acetonitrilo (ACN) y agua, con una proporción ACN:H₂O 35:65 (v/v).

Los parámetros utilizados para obtener los cromatogramas en este punto, basados en un método reportado previamente¹² fueron:

- Flujo: 0.7 ml/min
- Volumen de inyección: 10 µl
- Columna: Kinetex® 5µm EVO C18 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm
- Longitud de onda de medida: 270 y 285 nm
- Tiempo: 5 min

Una vez obtenida la recta de calibrado sin preconcentración, se llevaron a cabo las extracciones con los distintos diseños de dispositivos, con el objetivo de encontrar aquel que diera un mayor porcentaje de extracción y un mayor factor de enriquecimiento, es decir, un mejor desempeño, en general.

A continuación, se presenta el método para la SPE con resina Oasis HLB que se utilizó con los dispositivos más pequeños (5x5 y 5x6 Td), mientras que entre paréntesis se presentan

los volúmenes y tiempos que se emplearon en el método de extracción utilizando un dispositivo de mayor tamaño (8x8 Td).

- Acondicionamiento: 5 ml (15 ml) de MeOH, con agitación a 300 rpm, 1 min (3 min), seguido de un enjuague con 5 ml (15 ml) de agua, a 300 rpm, 1 min (3 min).
- Extracción: 50 ml de disolución patrón de SMX de concentración conocida, agitando a 300 rpm, durante 60 min.
- Elución mediante agitación: 5 ml (10 ml) MeOH, 15 min (30 min), 300 rpm.
- Elución mediante ultrasonidos: 5 ml MeOH, 15 min.

Solo se lleva a cabo una de las dos eluciones mencionadas con cada uno de los dispositivos, no son consecutivas.

- El eluato se seca con N₂ gas y se reconstituye con 1 ml ACN:H₂O (10:90).
- Antes de introducirlo en el HPLC, el extracto reconstituido se filtra mediante un filtro de nylon (0,45 µm) para eliminar pequeñas partes desprendidas del dispositivo o de la resina de SPE utilizada, y así, evitar obturar la columna.

Para hacer los blancos de reactivos, los procedimientos son los antes mencionados, cambiando la disolución patrón del proceso de extracción, por 50 ml de agua Milli-Q.

3.5. Ensayo para seleccionar la resina de SPE

Para seleccionar la resina de SPE a utilizar, en primer lugar, se imprimieron dos tandas de dispositivos y se llevó a cabo un ensayo recubriendo 14 dispositivos con la resina de SPE Oasis HLB y otros 14 dispositivos con la resina Oasis MCX.

Todos los dispositivos se pesaron antes y después de ser recubiertos, para determinar la cantidad de resina impregnada mediante la diferencia de estos pesos.

A continuación, se realizó un estudio mediante SEM para determinar el grado de adhesión de cada tipo de resina al dispositivo.

3.6. Optimización de los parámetros de extracción de sulfonamidas

Una vez que se seleccionaron el diseño y el tamaño más apropiados para el dispositivo y posteriormente la resina de SPE que más eficiencia de extracción presentó, se procedió a la optimización de los parámetros que afectan la extracción: el volumen de muestra y de eluyente y los tiempos de extracción.

A partir de este punto, se trabajó con siete sulfonamidas de interés (SAM, SDZ, SMR, SMZ, SMP, SMX, SDX), realizando la separación con un HPLC-DAD *Waters 600 HPLC System* con los siguientes parámetros de medida:

- Flujo: 1,00 ml/min
- Volumen de inyección: 10 μ l
- Columna: *Symmetry C18 Column, 100Å, 5 μ m, 3,9 mm X 150 mm*
- Longitud de onda de medida: 260 nm y 270 nm.
- Tiempo: 20 min.
- Fases móviles: A=H₂O (0,1% ácido fórmico.), B=ACN
- Gradiente (A:B): 95:5 de 0 a 4 min; 60:40 de 4 a 20 min

3.7. Curvas de calibrado y parámetros analíticos

En lo que respecta a las disoluciones para obtener la recta de calibrado de cada sulfonamida, en primer lugar, se preparó una disolución madre de 500 ppm de cada una en metanol.

A continuación, a partir de cada disolución madre, se prepararon las disoluciones patrón, mezclando las siete sulfonamidas, en la concentración deseada (0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; y 10 ppm), enrasando con agua Milli-Q hasta 100 ml. Con estas disoluciones patrón se realizaron las curvas de calibrado externas (sin utilizar el dispositivo 3D para su extracción).

Además, se realizaron curvas de calibrado con extracción y preconcentración mediante el uso del dispositivo 3D desarrollado, con disoluciones patrón de 0,1; 0,3; 0,8; 1,0 y 3,0 ppm.

Para calcular los LODs y LOQs, se analizaron 10 blancos de reactivos sin extracción y otros 10 con extracción. De sus señales analíticas se obtuvo la desviación estándar (s_{Blanco}) del blanco y se calcularon los LODs y LOQs según las siguientes ecuaciones:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{\text{Blanco}}}{b}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{\text{Blanco}}}{b}$$

Siendo b la pendiente de las curvas de calibración (sin y con extracción).

Por otra parte, el factor de enriquecimiento (FE) se calculó como el cociente entre la concentración de sulfonamida extraída y la concentración inicial del patrón. Mientras que

la eficiencia de extracción se calculó como el FE multiplicado por el factor de preconcentración (volumen de eluato=5 ml /volumen de muestra=50 ml) y se expresa en porcentaje.

4. Resultados y discusión

4.1. Diseños y selección del dispositivo 3D

En el grupo de Química Analítica Ambiental se ha trabajado anteriormente con dispositivos 3D de geometría cúbica, formados a su vez por cubos intercalados, para la extracción de otros contaminantes, como el uranio.¹³ Dado que los dispositivos cúbicos han dado resultados positivos, se decidió mantener esta geometría externa y explorar otras geometrías de las unidades que lo componen.

De esta forma, de entre las distintas alternativas de dispositivos cúbicos conformados por esferas, octaedros, bipirámides triangulares y otras geometrías reportadas en la bibliografía (Figura 9)⁷, se seleccionó el cubo formado por tetraedros (Td) debido a que presenta el diseño más simple, y por ello más fácil de reproducir.

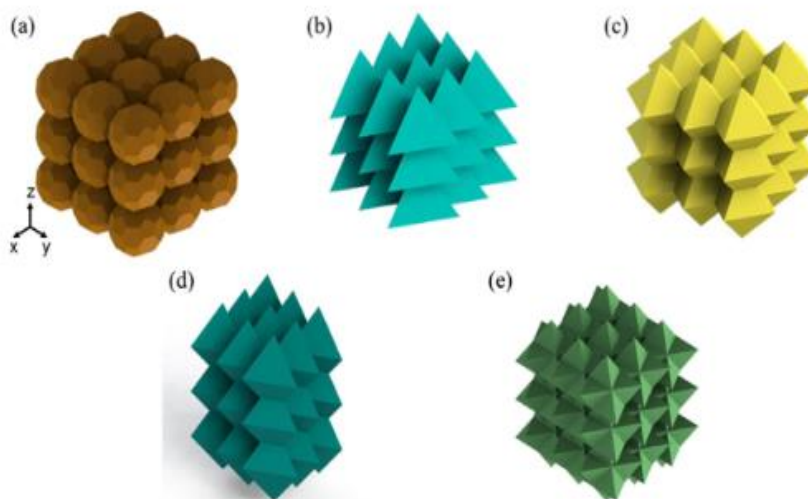


Figura 9: Distintas geometrías de dispositivos cúbicos impresos en 3D, formados por a) esferas, b) tetraedros, c) octaedros, d) bipirámides triangulares y e) estrella octogonal.⁷

Una vez seleccionado el formato del dispositivo, se procedió a diseñar dispositivos cúbicos formados por distintas cantidades de Td por cara (Figura 10) replicando el diseño de tetraedros mostrado en la Figura 9, con las medidas que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Dimensiones de los dispositivos cúbicos formados por Td diseñados e impresos en 3D.

	Td 3x3	Td 5x5	Td 5x6	Td 8x8
Lado del Td (mm)	3,7	2,78	2,20	2,25
Vol. del cubo (cm ³)	1	1	1	2,09
Intercalado lateral (mm)	0,35	0,88	0,25	0,35
Intercalado superior-inferior (mm)	1,0	0,5	0,5	0,5
Poros (triangulo equilátero) (mm/lado)	1,75	0,88	1,0	1,0

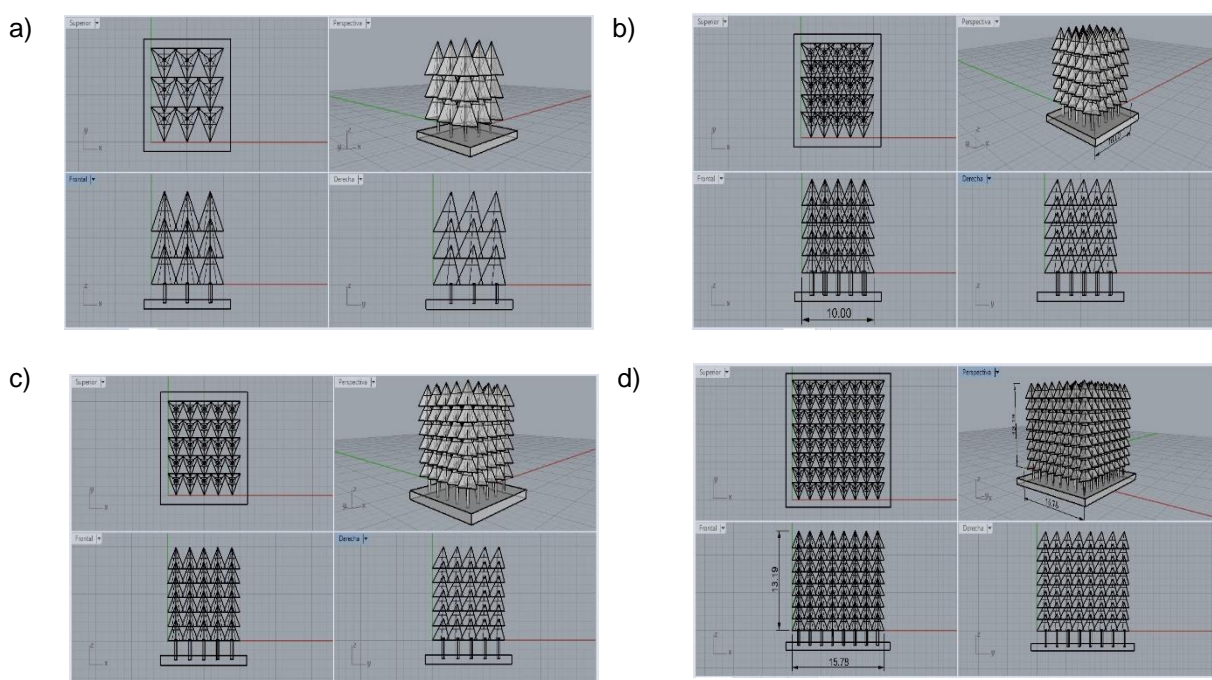


Figura 10: Diseño de dispositivos cúbico formado por a) 3x3 Td; b) 5x5 Td; c) 5x6 Td; d) 8x8 Td.

En primer lugar, se imprimió el dispositivo 3x3 Td, para verificar que podía imprimirse sin mayor dificultad, con las impresoras disponibles. Dado que los resultados fueron positivos, se procedió a imprimir los diseños cúbicos formados por 5x6 y 8x8 Td, que aportan una mayor superficie específica a la que pudiera adherirse la resina de SPE, manteniendo la misma geometría.

Los dispositivos se imprimieron, se recubrieron con resina de extracción Oasis HLB, y se llevaron a cabo con ellos ensayos preliminares de extracción, para establecer el diseño óptimo que permitiera el mejor desempeño.

El dispositivo 8x8 Td fue descartado, debido a que, por su mayor peso y tamaño, no se pudo realizar una agitación eficiente. Por el contrario, con el dispositivo 5x6 Td, se llevó a cabo una buena ejecución del método de extracción de SMX, utilizando el protocolo con ultrasonidos explicado en el apartado 3.4. Dado que, con este diseño el porcentaje de extracción solo fue de un 23%, se procedió a realizar algunas modificaciones del diseño para aumentar la superficie recubierta por la resina de SPE, y aumentar así el % de extracción. Así, el siguiente diseño se focalizó en cambiar algunas medidas para optimizar el proceso de extracción (Figura 11).

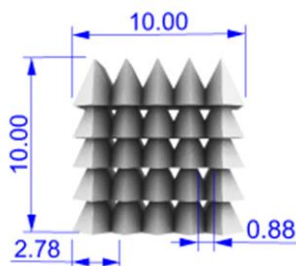


Figura 11: Medidas (mm) del diseño compuesto por 5x5 Td

Este diseño, compuesto de 5x5 Td, se ensayó con dos protocolos de elución, alcanzando un 46% de extracción con agitación y un 39% con ultrasonidos. De este modo, el % de extracción empleando ultrasonidos en la etapa de elución aumentó un 16% respecto al diseño anterior. Y como, además, en el caso de la elución mediante agitación se logró un aumento del 23% de extracción respecto al diseño anterior, se seleccionó este diseño, compuesto por 5x5 Td y extracción mediante agitación para llevar a cabo la fase experimental restante correspondiente a este TFG.

4.2. Selección de la resina de extracción

Una vez escogido el diseño del dispositivo que ofrece mejor desempeño, el siguiente paso consistió en seleccionar la resina de SPE que permita la mayor extracción de las sulfonamidas. Para ello, se recubrieron algunos dispositivos 5x5 Td con resina Oasis HLB, con la cual se llevaron a cabo los ensayos preliminares y otros con la resina Oasis MCX, utilizando en ambos casos el mismo proceso descrito en el apartado 3.3.

Como primer paso, se hizo un estudio gravimétrico y se tomaron fotografías mediante el SEM para comprobar si el recubrimiento era similar de una resina respecto a la otra.

El estudio gravimétrico, se llevó a cabo recubriendo 14 dispositivos (todos impresos en la misma tanda) con cada una de las resinas, obteniendo el peso de las resinas por diferencia

(antes y después de recubrir). Como puede observarse en la Tabla 2, las dos tandas de dispositivos en 3D presentan diferencias muy muy significativas entre las masas con una confianza del 99,9%. La diferencia de peso de los dispositivos utilizando el mismo diseño se debe a que se imprimieron con diferentes impresoras, siendo los de menor peso los impresos con la Form3 que tiene mayor resolución, y los de mayor peso con la Form2, aunque este resultado no es relevante para los objetivos marcados en el presente TFG. Por el contrario, cabe destacar las diferencias encontradas entre las masas de resina de extracción que forman el recubrimiento. El recubrimiento con la resina Oasis HLB presenta una masa promedio de $13,8 \pm 1,6$ mg de resina por dispositivo, sin tener en cuenta aquellos recubrimientos por debajo de 10 mg. Mientras que el recubrimiento con la resina Oasis MCX presenta una masa promedio de 37 ± 11 mg de resina por dispositivo. Para esta resina se descartaron aquellos recubrimientos por debajo de 20 mg.

Tabla 2. Masas de los dispositivos cúbicos formados por 5x5 Td y de las resinas Oasis HLB y MCX con las que fueron recubiertos. Los valores en letra roja fueron descartados.

Dispositivo	Oasis HLB		Oasis MCX	
	Masa dispositivo (g)	Masa resina (mg)	Masa dispositivo (g)	Masa resina (mg)
1	0,4147	13,6	0,4845	23,1
2	0,4134	12,3	0,4735	12,1
3	0,4128	11,7	0,4909	29,5
4	0,4154	14,3	0,4986	37,2
5	0,4121	11	0,4793	17,9
6	0,4087	7,6	0,5032	41,8
7	0,4110	9,9	0,4705	9,1
8	0,4170	15,9	0,5191	57,7
9	0,4162	15,1	0,4879	26,5
10	0,4072	6,1	0,5075	41,9
11	0,4068	5,7	0,5091	43,5
12	0,4171	16	0,4884	22,8
13	0,4163	15,2	0,4784	12,8
14	0,4142	13,1	0,5113	45,7
Media \pm desviación estándar	$0,413 \pm 0,003$	$13,8 \pm 1,6$	$0,493 \pm 0,014$	37 ± 11
RSD (%)	0,8	12,1	2,9	29,1

Para observar el grado de recubrimiento con cada resina, se llevaron las muestras a microscopía SEM y se obtuvieron las imágenes que se muestran en la Figura 12.

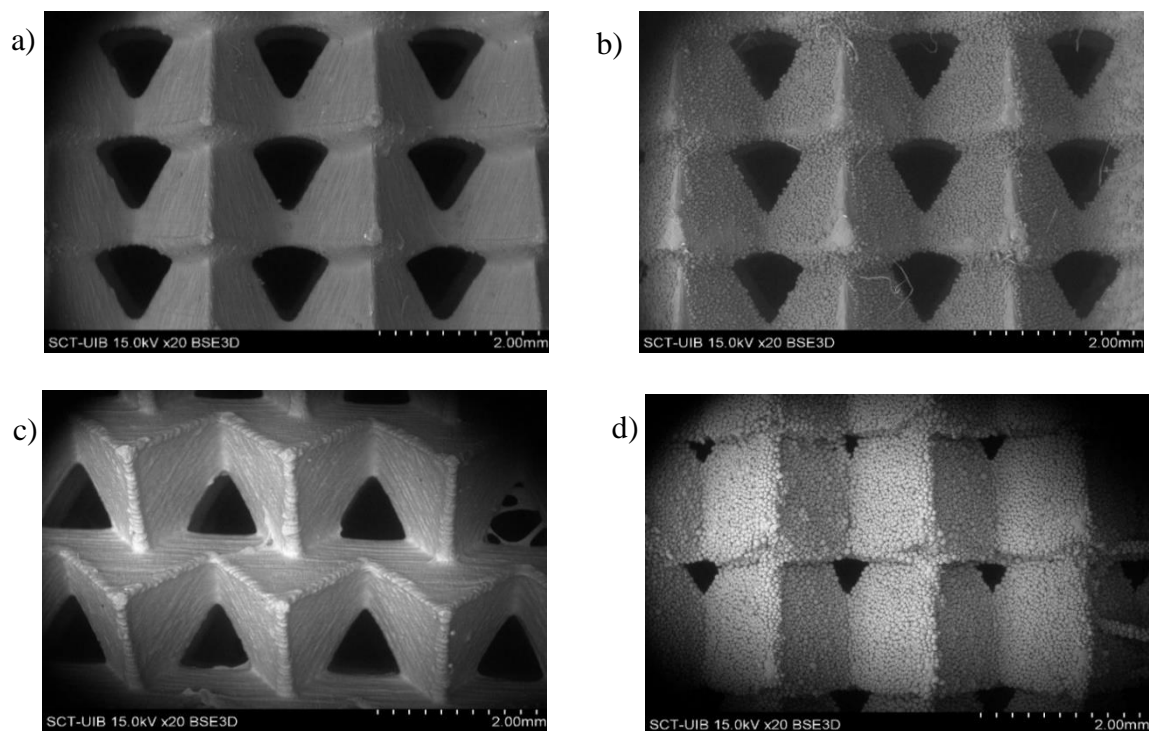


Figura 12: Imágenes obtenidas con SEM de a) Dispositivo sin recubrir y b) recubierto con resina Oasis HLB; y de c) Dispositivo sin recubrir y d) recubierto con resina Oasis MCX.

Como puede verse en la Figura 12, la resina Oasis MCX presenta una cobertura más homogénea de la superficie del dispositivo, dando lugar así a un mayor recubrimiento del mismo y confirmando los resultados del estudio gravimétrico.

En base a estos resultados, se escogió la resina Oasis MCX como resina de SPE a utilizar en el resto de las pruebas referentes a la extracción de las distintas sulfonamidas. Considerando la elevada desviación estándar relativa que presenta la masa de esta resina, 29,1% RSD (n=10), a partir de aquí, se procedió a medir la masa en todos los dispositivos a utilizar, para usar solo aquellos cuyo recubrimiento sea mayor a 20 mg de resina de Oasis MCX.

4.3. Optimización

Respecto al método de extracción se optimizaron tres variables: el tipo de eluyente, el volumen de eluyente y el tiempo de extracción. Para estos ensayos de optimización se emplearon siete sulfonamidas de un cóctel de patrón conteniendo 0,5 ppm para cada una, que se separaron usando un HPLC Waters 600, con los parámetros indicados en el

apartado 3.6. Los resultados correspondientes a estos parámetros pueden observarse en las Figuras 13,14 y 15.

En cuanto al tipo de eluyente, se estudió la elución con metanol y con una disolución de metanol:hidróxido de amonio 95:5 v/v, y se compararon las áreas obtenidas para cada sulfonamida.^{12,15,16} Los resultados obtenidos indicaron que la extracción llevada a cabo con la disolución metanol:hidróxido de amonio, da lugar a señales analíticas más elevadas para todas las sulfonamidas, indicando que se favorece la elución con la presencia de una base y por ello se seleccionó como eluyente (Figura 13).

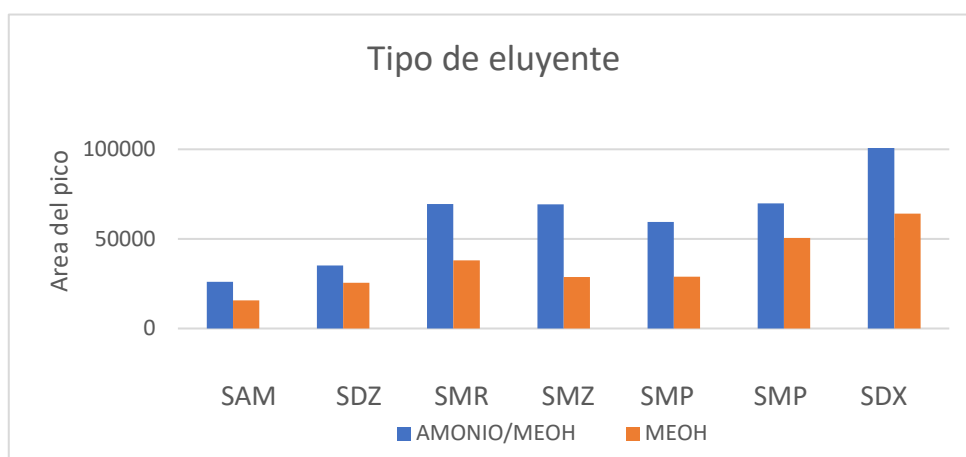


Figura 13: Señales analíticas obtenidas con dos tipos de eluyentes de siete sulfonamidas, usando la resina Oasis CMX como extractante.

Una vez seleccionado el eluyente, se probaron dos volúmenes para llevar a cabo la extracción: 5 y 10 ml. Los resultados mostraron que con 5 ml de MeOH:NH₄OH (95:5 v/v) los porcentajes de extracción ya son los máximos y por ello, se seleccionó un volumen de 5 ml de eluyente en las siguientes extracciones (Figura 14).

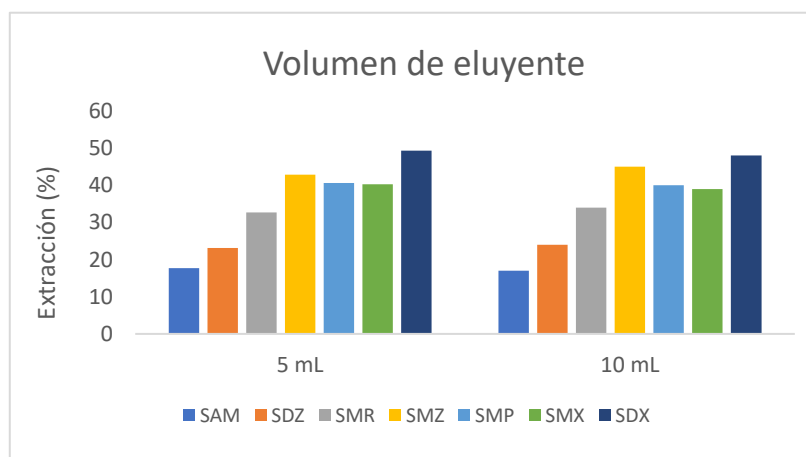


Figura 14: Porcentajes de extracción de siete sulfonamidas obtenidos con 5 y 10 ml de una disolución MeOH:NH₄OH (95:5 v/v) usada como eluyente usando la resina Oasis CMX como extractante.

Por último, se estudió el efecto del tiempo de extracción sobre el porcentaje de extracción de las sulfonamidas estudiadas. Como se puede ver en la Figura 15, el mayor porcentaje de extracción para todas las sulfonamidas se alcanzó a los 50 min. Sin embargo, debido a que la diferencia respecto a la extracción de 30 min no se considera significativa, se decidió proceder con una extracción de 30 min, ya que podían realizarse una mayor cantidad de extracciones en un mismo día obteniendo buenos resultados.

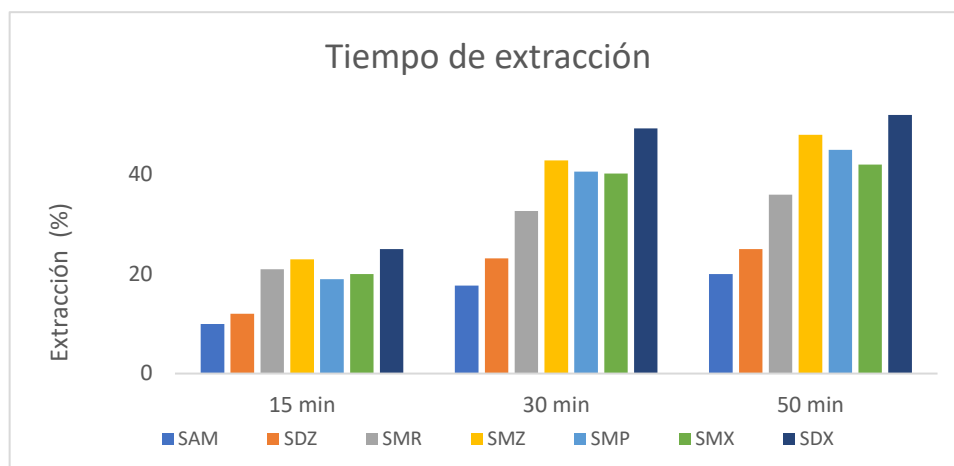


Figura 15: Porcentajes de extracción en función de diferentes tiempos de extracción utilizados.

De esta forma, el método de extracción óptimo, que se usó de aquí en adelante consiste en:

- Acondicionamiento: 5 ml metanol, 5 min. Seguido de 5 ml agua, 5 min. Con agitación a 300 rpm.
- Extracción: 50 ml del cóctel patrón de sulfonamidas de concentración conocida, 300 rpm, 30 min.
- Elución: 5 ml MeOH (5% NH₄OH), 15 min, 300 rpm.
- El eluato se filtra mediante un filtro de nylon de 0,45 µm y se procede a inyectarlo en el HPLC.

Los blancos de reactivos se obtienen mediante el mismo proceso, analizando 50 ml de agua Milli-Q.

4.4. Curvas de calibrado

Una vez establecidos los valores de las variables que afectan el proceso de extracción, se procedió a llevar a cabo una curva de calibrado externa para el cóctel patrón de las 7 sulfonamidas a caracterizar. De esta forma, se obtuvo una curva de calibrado para cada una de ellas, mediante el HPLC-DAD. Los tiempos de retención y el promedio de las áreas

de cada uno de los analitos se detallan en la Tabla 3. En base a estos resultados, se obtuvieron las rectas de calibrado que se muestran en la Figura 16.

Tabla 3. Señales analíticas y tiempos de retención de las siete sulfonamidas estudiadas. Los resultados están expresados como el promedio del área de cada pico cromatográfico \pm desviación estándar ($n=3$).

Tiempo de retención	2,9 min	7,8 min	12,1 min	13,7 min
Concentración (ppm)	Área SAM	Área SDZ	Área SMR	Área SMZ
0,1	2022 \pm 63	2244 \pm 65	2774 \pm 55	3237 \pm 64
0,3	7711 \pm 85	8719 \pm 310	10172 \pm 141	9518 \pm 143
0,5	14267 \pm 134	15571 \pm 215	18790 \pm 538	14447 \pm 165
0,8	23469 \pm 99	24570 \pm 359	32695 \pm 434	25700 \pm 238
1,0	29532 \pm 184	29711 \pm 52	42030 \pm 926	32523 \pm 393
2,0	49894 \pm 342	50957 \pm 280	73248 \pm 161	58476 \pm 472
4,0	111590 \pm 564	122025 \pm 2117	156338 \pm 907	126400 \pm 176
10,0	277214 \pm 890	304083 \pm 409	386348 \pm 1422	309860 \pm 1335

Tiempo de retención	14,5 min	16,6 min	18,2 min
Concentración (ppm)	Área SMP	Área SMX	Área SDX
0,1	3419 \pm 115	3515 \pm 42	4166 \pm 99
0,3	8543 \pm 97	10625 \pm 31	13140 \pm 185
0,5	14136 \pm 75	17344 \pm 58	19149 \pm 58
0,8	23327 \pm 254	27601 \pm 138	33301 \pm 526
1,0	29599 \pm 109	34884 \pm 253	40986 \pm 195
2,0	53399 \pm 435	62027 \pm 543	74349 \pm 386
4,0	115190 \pm 93	134677 \pm 110	158720 \pm 339
10,0	284853 \pm 725	332860 \pm 419	389534 \pm 626

Todas presentan un buen ajuste en el rango lineal estudiado. Estas curvas de calibración se utilizaron como referencia para el cálculo del porcentaje de extracción obtenido, utilizando las áreas de los picos correspondientes a cada uno de los analitos.

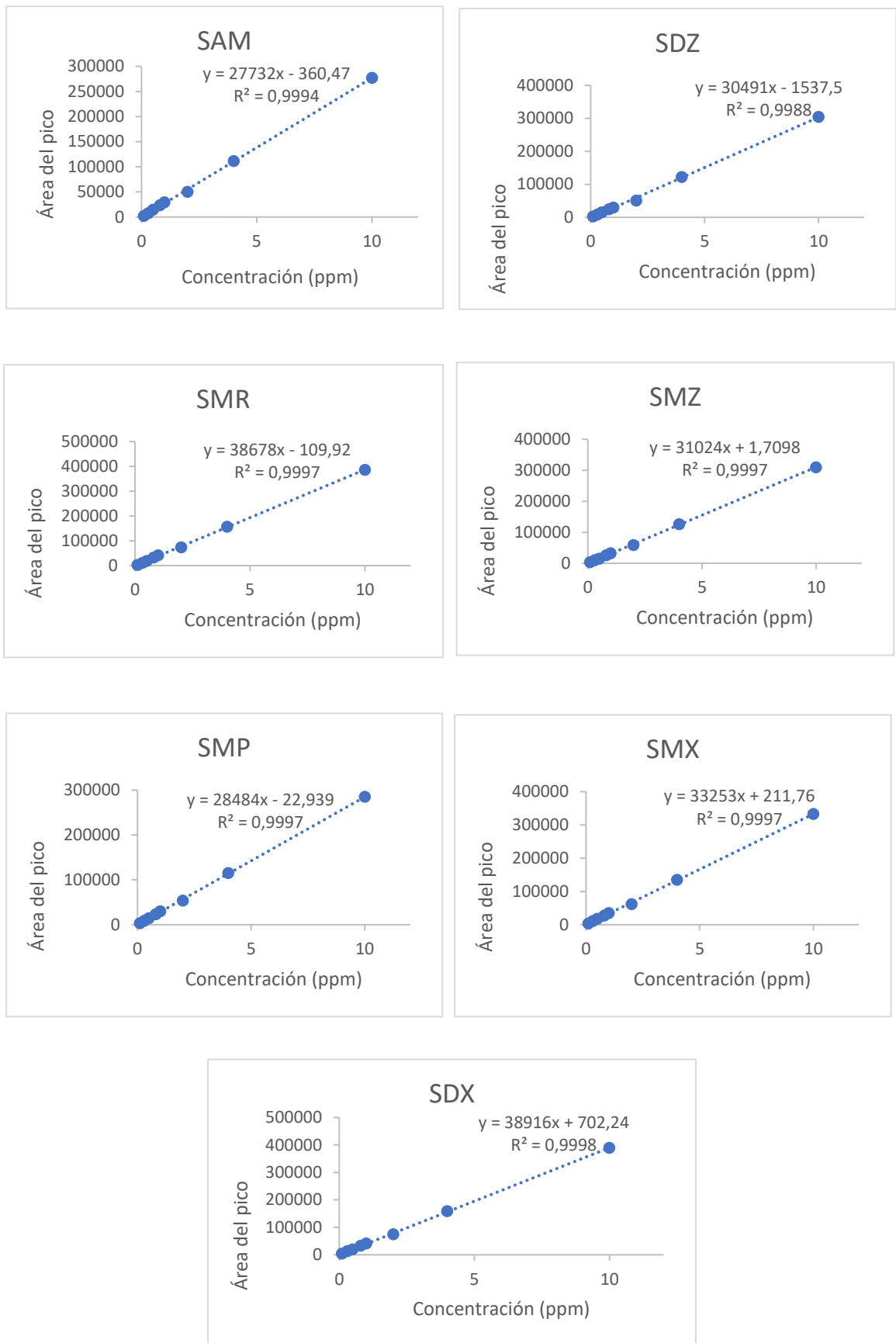


Figura 16: Curvas de calibrado externas de las siete sulfonamidas estudiadas.

En este punto, se realizaron extracciones mediante el dispositivo 3D recubierto con la resina Oasis CMX para distintas concentraciones de sulfonamidas con el objetivo de construir curvas de calibrado con extracción, y así poder comparar las pendientes, el rango lineal de trabajo, y también calcular para cada sulfonamida un porcentaje de extracción promedio y su factor de enriquecimiento (Figura 17). Si comparamos las rectas de calibrado obtenidas sin preconcentrar con las obtenidas una vez llevada a cabo la extracción, podemos observar que el rango lineal de estas últimas es más corto, mientras que las pendientes son más elevadas.

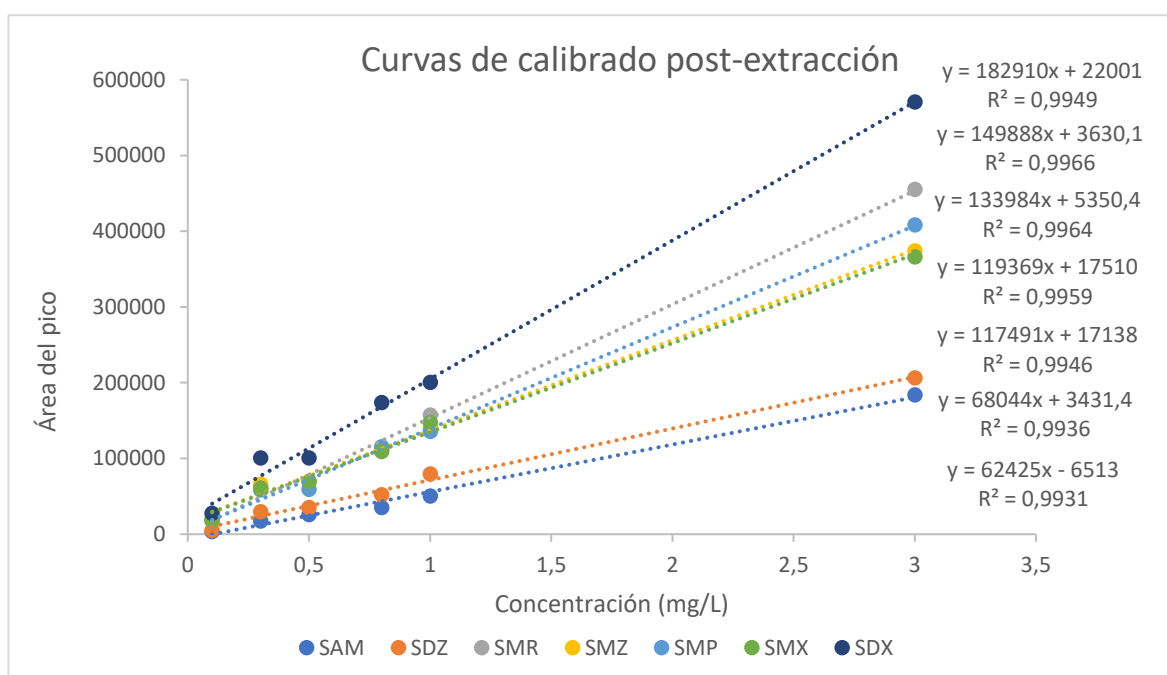


Figura 17: Curvas de calibrado de preconcentración.

En la Figura 18 se muestra un cromatograma obtenido para las siete sulfonamidas estudiadas, sin extraer (inyección directa de la disolución patrón en el HPLC-DAD),

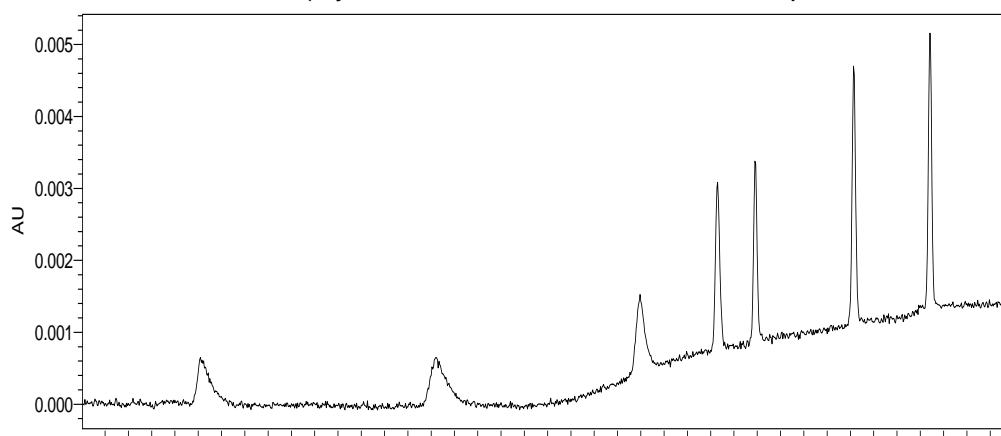


Figura 18: Cromatograma de las sulfonamidas sin extracción.

mientras que en la Figura 19 se presenta un cromatograma de las siete sulfonamidas después de la extracción mediante el dispositivo 3D.

Puede observarse, que el cromatograma obtenido mediante extracción con el dispositivo 3D desarrollado presenta una línea de base estable, y un pico extra a 17,5 min de retención.

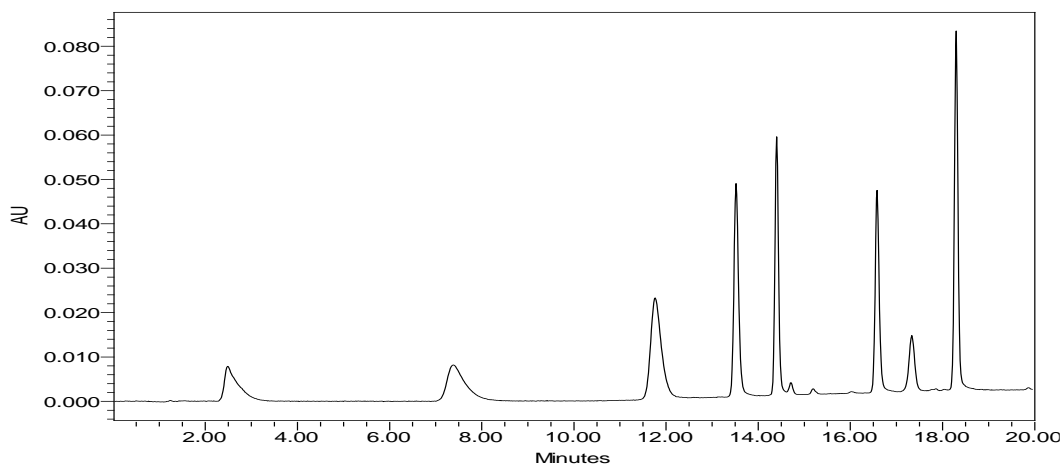


Figura 19: Cromatograma de las sulfonamidas extraídas mediante el dispositivo 3D.

Dado que mismo pico aparece en los blancos de reactivos empleando el dispositivo 3D para la extracción (Figura 20), se puede concluir que este pico corresponde a alguna sustancia que se desprende de la resina de impresión.

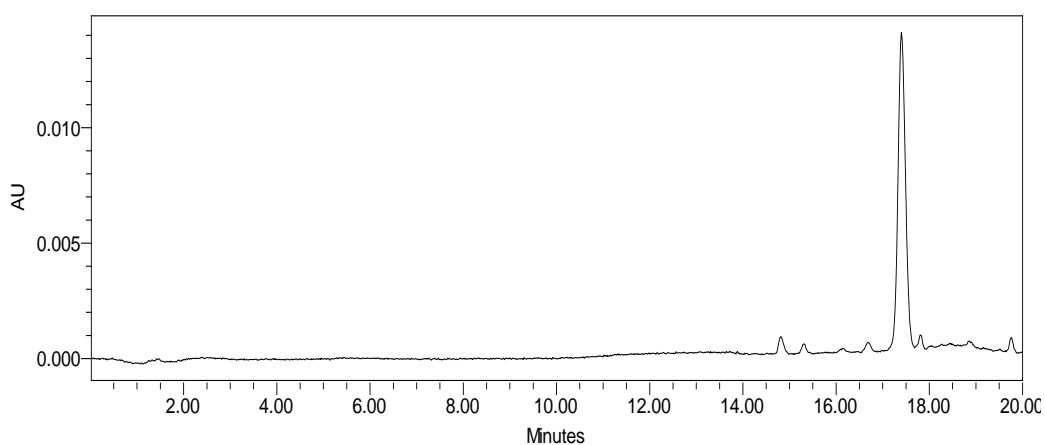


Figura 20: Cromatograma del blanco de reacción de la extracción mediante el dispositivo 3D.

4.5. Parámetros analíticos

Los resultados obtenidos en cuanto a porcentajes de extracción y al factor de enriquecimiento se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Factores de enriquecimiento y porcentajes de extracción y para las sulfonamidas estudiadas en un rango de concentraciones entre 0,1 y 3 ppm.

	SAM	SDZ	SMR	SMZ	SMP	SMX	SDX
Factor enriquecimiento	1,8±0,2	2,4±0,5	3,9±0,9	3,9±0,9	5±1	4,5±0,9	5,8±1,4
% extracción	17,6±2,2	24±5	39±9	39±9	52±10	45±9	58±14

El rango de extracción más bajo se obtuvo para el SAM, entre 15-20%, mientras que el SDX presentó el rango de extracción más elevado, entre en el 44-72 %. Esto puede deberse a una mayor afinidad con la resina de SPE, ya que la SAM tiene un único grupo amino como sustituyente, la SDX cuenta con un sustituyente mucho más complejo (2 átomos de nitrógeno y dos sustituyentes CH₃O), que la hacen más polar.

Para terminar, se determinaron el LOD y el LOQ antes y después de la extracción llevando a cabo 10 blancos de reactivos en cada caso (Tabla 5).

Tabla 5. LOD, LOQ y sensibilidad calculadas para el método cromatográfico y para el método de extracción con el dispositivo 3D y posterior separación cromatográfica.

sulfonamida	Sin extracción			Extracción mediante dispositivo 3D		
	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Sensibilidad (pendiente curva de calibración)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Sensibilidad (pendiente curva de calibración)
SAM	89	298	27732	21	70	62425
SDZ	103	344	30491	8	31	68044
SMR	74	352	38678	4	35	117491
SMZ	71	251	31024	6	39	119369
SMP	69	220	28484	4	32	133984
SMX	50	187	33253	7	45	149888
SDX	54	239	38916	4	42	182910

Como podemos observar en la Tabla 5, tanto el LOD como el LOQ disminuyen considerablemente para todas las sulfonamidas, una vez se ha preconcentrado el analito.

En cuanto los rangos lineales de trabajo, las curvas de calibración externas presentan un buen ajuste entre 0,1 y 10 ppm, mientras que las curvas obtenidas con extracción/preconcentración, presentan un rango lineal más estrecho, entre 0,1 y 3 ppm.

Al evaluar la sensibilidad en términos de las pendientes de ambas curvas de calibración, puede observarse que al utilizar extracción/preconcentración la sensibilidad para todas las sulfonamidas es mayor.

5. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados experimentales obtenidos sobre el diseño, impresión, recubrimiento y optimización de un dispositivo 3D para la extracción y posterior determinación de sulfonamidas mediante HPLC-DAD, pueden deducirse las siguientes conclusiones:

- Se ha llevado a cabo con éxito el diseño y fabricación de un dispositivo 3D que funciona como soporte de resinas de SPE.
- Se ha comprobado que la resina Oasis MCX presenta un mejor desempeño respecto a la Oasis HBL, en cuanto al recubrimiento del dispositivo diseñado y a la extracción de las sulfonamidas.
- Se han determinado los porcentajes de extracción y factor de enriquecimiento para todas las sulfonamidas estudiadas, comprobando la capacidad del dispositivo 3D recubierto para extraer y preconcentrar las sulfonamidas a determinar.
- Se han establecido los límites LOD y LOQ, el rango lineal de trabajo y la sensibilidad para la determinación simultánea de siete sulfonamidas mediante el método propuesto, comprobando que los LODs, LOQs y rangos lineales disminuyen una vez se ha preconcentrado la muestra mediante el dispositivo 3D, mientras que la sensibilidad aumenta.

En general, los resultados obtenidos se consideran satisfactorios, aunque habría que llevar a cabo otras pruebas para comprobar si es factible la reutilización del dispositivo 3D, mejorar los porcentajes de extracción de alguna de las sulfonamidas estudiadas y realizar ensayos con muestras reales, para comprobar si la aplicación de este dispositivo es factible en muestras de aguas residuales.

6. Bibliografía

- (1) D.L. Barceló; M.J. López de Alda, Contaminación y Calidad Química Del Agua: El Problema de Los Contaminantes Emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona).
- (2) M.J. Gil; A.M. Soto; I.J. Usma; D.O. Gutiérrez, Emerging Contaminants in Waters: Effects and Possible Treatments. Producción + Limpia 7 (2012) pp.52-73. Print version ISSN 1909-0455.
- (3) DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2018/ 840 DE LA COMISIÓN - de 5 de Junio de 2018. por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, y se deroga la Decisión de Ejecución (UE) 2015/495 de la Comisión.
- (4) Sulfonamidas - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/sulfonamidas> (accessed 2022-09-01).
- (5) El río Manzanares es el más contaminado por fármacos de Europa | Ciencia | EL PAÍS. <https://elpais.com/ciencia/2022-02-14/el-rio-manzanares-es-el-mas-contaminado-por-farmacos-de-europa.html> (accessed 2022-09-01).
- (6) J.L. Wilkinson; A. B. A. Boxall; D.W. Kolpin; C. Teta, Pharmaceutical Pollution of the World's Rivers. Proc Natl Acad Sci, 119 (2022) e2113947119. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2113947119>.
- (7) H. Agrawaal; J.E. Thompson, Additive Manufacturing (3D Printing) for Analytical Chemistry. Talanta Open 3 (2021) 100036. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100036>.
- (8) J. Clavijo, Caracterización de Materiales a Través de Medidas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Elementos 3 (2013) 3. <https://doi.org/10.15765/E.V3I3.420>.
- (9) Rhino - Características. <https://www.rhino3d.com/features/> (accessed 2022-07-25).
- (10) Impresoras 3D de Formlabs. <https://formlabs.com/es/3d-printers/catalog/> (accessed 2022-07-25).
- (11) Productos de extracción Oasis | Waters. https://www.waters.com/waters/es_ES/Productos-Oasis-para-extracci%C3%B3n-de-muestras/nav.htm?cid=513209&locale=es_ES (accessed 2022-07-26).
- (12) A. Białk-Bielińska; G. Siedlewicz; P. Stepnowski; K. Pazdro; A. Fabia; J. A. Kumirska, Very Fast and Simple Method for the Determination of Sulfonamide Residues in Seawaters. Anal. Methods 3 (2011) 1371-1378. <https://doi.org/10.1039/c0ay00763c>.

- (13) M. Rodas Ceballos; F. González Serra; J. M. Estela; V. Cerdà; L. Ferrer, 3D Printed Resin-Coated Device for Uranium (VI) Extraction. *Talanta* 196 (2019) 510–514. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.055>.
- (14) V. K. Balakrishnan; K. A. Terry; J. Toito, Determination of Sulfonamide Antibiotics in Wastewater: A Comparison of Solid Phase Microextraction and Solid Phase Extraction Methods. *J Chromatogr A* 1131 (2006) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.011>.
- (15) S. G. Dmitrienko; E. V. Kochuk; V. V. Apyari; V. V. Tolmacheva; Y. A. Zolotov, Recent Advances in Sample Preparation Techniques and Methods of Sulfonamides Detection – A Review. *Anal Chim Acta* 850 (2014) 6–25. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2014.08.023>.
- (16) S. A. Errayess; A. A. Lahcen; L. Idrissi; C. Marcoaldi; S. Chiavarini; A. A. Amine, Sensitive Method for the Determination of Sulfonamides in Seawater Samples by Solid Phase Extraction and UV–Visible Spectrophotometry. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 181 (2017) 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.03.061>.