



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DESARROLLO DE NUEVOS SOPORTES PARA  
SISTEMAS ANALÍTICOS DE EXTRACCIÓN  
POR ELECTROMEMBRANA**

TESIS DOCTORAL

*Cristina Román Hidalgo*

*Sevilla, Diciembre 2018*



DESARROLLO DE NUEVOS SOPORTES PARA SISTEMAS  
ANALÍTICOS DE EXTRACCIÓN POR  
ELECTROMEMBRANA

**El Director**

**La Directora**

**Fdo.: D. Miguel Ángel Bello López**

**Fdo.: Dña. María Jesús Martín Valero**

Catedrático de Universidad  
Departamento de Química Analítica  
Universidad de Sevilla

Profesora Titular de Universidad  
Departamento de Química Analítica  
Universidad de Sevilla

Memoria presentada por Cristina Román Hidalgo para optar al título de  
Doctor en Química con Mención Internacional por la Universidad de  
Sevilla.

Fdo.: Cristina Román Hidalgo

Graduada en Química



D. FERNANDO DE PABLOS PONS, CATEDRÁTICO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado “**Desarrollo de nuevos soportes para sistemas analíticos de extracción por electromembrana**”, que constituye la Memoria presentada por Cristina Román Hidalgo para aspirar al grado de Doctor en Química con Mención Internacional, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Doctores Miguel Ángel Bello López y María Jesús Martín Valero, profesores de este Departamento, reuniendo a mi juicio las condiciones exigidas para este tipo de trabajos.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 18 de diciembre de 2018.

Fdo.: Fernando de Pablos Pons



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a los directores de este trabajo, D. Miguel Ángel Bello López y Dña. María Jesús Martín Valero, por su constante apoyo y estímulo. Gracias por confiar en mí, por toda la atención y ayuda prestada, por todos los conocimientos que me han enseñado y por el trato personal recibido.

A la Universidad de Sevilla, por la ayuda concedida para la realización de esta Tesis Doctoral, a través del V Plan Propio de Investigación.

Al Director del Departamento de Química Analítica, D. Fernando de Pablos Pons, por permitirme llevar a cabo este trabajo y facilitarme los medios necesarios para ello.

A todos mis compañeros y componentes del Grupo de Investigación, por su eterna disposición y generosidad y por su amistad. A Mercedes, Rut, Manolo, Juan Luis, Noemí, Julia y, en general, a todo el personal del Departamento de Química Analítica, docentes y no docentes, por todos los buenos momentos compartidos y por tenderme la mano siempre que lo he necesitado.

A los supervisores de las diferentes estancias realizadas: Proffesor Stig Pedersen-Bjergaard, Dr. Nickolaj J. Petersen y Proffesor Jörg P. Kutter de la Universidad de Copenhague (Dinamarca), y Dr. Pavel Kubáň (Brno, República Checa). Thanks to all of them for giving me the opportunity to work with them and to learn from their experience.

A mis amigos químicos, Alejandra, Bea, Patri, Joselu y Jose, y a los no químicos, por estar ahí siempre, por apoyarme y darme ánimos en todo momento y por hacerme reír.

Y, por último, a toda mi familia y, en especial, a mis padres y a mi hermana, por su eterna confianza y apoyo. Sin su ayuda, no hubiera sido posible.

A todos, muchas gracias.





# ÍNDICE

---



<b>OBJETO DE LA TESIS</b> .....	5
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1.1. Técnicas de extracción.....	14
1.2. Extracción por electromembrana (EME).....	21
1.2.1. Evaluación del rendimiento de la extracción.....	30
1.2.2. Parámetros operacionales que influyen en el procedimiento EME.....	31
1.2.2a. Membrana líquida soportada (SLM).....	31
1.2.2b. pH de las fases aceptora y donadora.....	32
1.2.2c. Voltaje.....	33
1.2.2d. Agitación.....	34
1.2.2e. Tiempo.....	34
1.3. Soportes tradicionales en EME y alternativas recientes.....	34
REFERENCIAS.....	37
<b>CAPÍTULO 2. FILMS DE AGAR CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)</b> .....	49
SUMMARY.....	51
2.1. Descripción del soporte.....	53
2.1.1. Propiedades del agar.....	53
2.1.2. Nanopartículas de plata.....	56
2.1.3. Soporte estudiado.....	59
2.2. Síntesis.....	59
2.3. Caracterización.....	60

2.4. Estabilidad.....	63
2.5. Dispositivo experimental.....	64
2.6. Compuestos estudiados.....	66
2.7. Determinación cromatográfica.....	69
2.8. Resultados.....	72
2.8.1. Ensayos preliminares.....	72
2.8.2. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora.....	74
2.8.3. Influencia del espesor del film y del tamaño de las AgNPs.....	75
2.8.4. Influencia del voltaje de extracción.....	78
2.8.5. Influencia del tiempo de extracción.....	79
2.8.6. Procedimiento propuesto.....	80
2.8.7. Comparación de los films nanometálicos con otros soportes...	80
REFERENCIAS.....	84
<b>CAPÍTULO 3. TEJIDOS NANOESTRUCTURADOS TISS®-OH.....</b>	<b>89</b>
SUMMARY.....	91
3.1. Descripción del soporte.....	93
3.2. Dispositivo experimental.....	96
3.3. Compuestos estudiados.....	98
3.4. Determinación cromatográfica.....	101
3.5. Resultados.....	104
3.5.1. Estudios previos del comportamiento de diferentes tipos de tejidos.....	104
3.5.2. Ensayos preliminares.....	106

3.5.3. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora.....	107
3.5.4. Influencia del voltaje de extracción.....	109
3.5.5. Influencia del tiempo de extracción.....	110
3.5.6. Influencia del volumen de las fases donadora y aceptora.....	110
3.5.7. Influencia de la concentración de carrier.....	111
3.5.8. Validación.....	111
3.5.9. Aplicación a muestras reales.....	113
REFERENCIAS.....	116
<b>CAPÍTULO 4. MEMBRANAS DE INCLUSIÓN POLIMÉRICA (PIMs).....</b>	<b>119</b>
SUMMARY.....	121
4.1. Descripción del soporte.....	123
4.2. Síntesis.....	124
4.3. Dispositivo experimental.....	124
4.4. Compuestos estudiados y determinación cromatográfica.....	126
4.5. Resultados.....	129
4.5.1. Ensayos preliminares.....	129
4.5.1.1. Optimización de la síntesis de PIMs.....	129
4.5.1.2. Elección del disolvente orgánico como SLM.....	131
4.5.2. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora.....	132
4.5.3. Influencia del voltaje de extracción.....	133
4.5.4. Influencia del tiempo de extracción.....	134
4.5.5. Influencia del volumen de las fases donadora y aceptora.....	135
4.5.6. Validación y aplicación a muestras reales.....	136

REFERENCIAS.....	141
<b>CAPÍTULO 5. MEMBRANAS DE QUITOSANO.....</b>	<b>145</b>
SUMMARY.....	147
5.1. Descripción del soporte.....	149
5.2. Síntesis.....	151
5.3. Dispositivo experimental.....	151
5.4. Resultados.....	153
5.4.1. Optimización de la composición y del espesor de la membrana.....	153
5.4.2. Disolvente orgánico empleado como SLM.....	157
5.4.3. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora y del voltaje de extracción.....	158
5.4.4. Influencia del tiempo de extracción.....	161
5.4.5. Validación.....	161
5.4.6. Aplicación a muestras reales.....	163
REFERENCIAS.....	167
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO I. Publicaciones científicas derivadas de la tesis.....</b>	<b>181</b>
<b>ANEXO II. Estancias en centros de investigación.....</b>	<b>185</b>

## OBJETO DE LA TESIS





El objetivo de esta Tesis es el desarrollo de nuevos materiales para su uso como soportes de la membrana líquida en sistemas de extracción por electromembrana, proporcionando alternativas viables a los soportes tradicionalmente usados. Se pretende la obtención de materiales de diferente naturaleza y estructura química para su participación activa en el procedimiento de extracción por electromembrana.

Se propone la incorporación a la estructura química del soporte de determinadas especies, como nanopartículas metálicas o ciertos grupos funcionales, a fin de crear interacciones específicas entre el soporte y los analitos que favorezcan, e incluso posibiliten, la extracción de los mismos. Se propone el uso de cuatro materiales de distinta naturaleza y características: films de agar con nanopartículas de plata (AgNPs), tejidos nanoestructurados Tiss®-OH, membranas de inclusión polimérica (PIMs) y membranas de quitosano.

Se analizan para ello los diferentes parámetros experimentales que influyen en el proceso de extracción de una serie de analitos seleccionados mediante su posterior determinación por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta. Asimismo, se estudia la aplicabilidad de los métodos propuestos en la determinación de dichos compuestos en matrices biológicas.



The main goal of this Thesis is the development of new materials as supports of the liquid membrane in electromembrane extraction systems, providing viable alternatives to traditionally used supports. The aim is to obtain materials of different nature and chemical structure for their active participation in the electromembrane extraction procedure.

It is proposed the inclusion of certain species, such as metal nanoparticles or some functional groups, into the chemical structure of the support in order to create specific interactions between the support and the analytes that could favor, and even allow, their extraction. The use of four materials with different nature and characteristics is proposed: agar films with silver nanoparticles (AgNPs), nanostructured tissues Tiss®-OH, polymeric inclusion membranes (PIMs) and chitosan membranes.

Different experimental parameters of the extraction process of selected compounds are analyzed and subsequently determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection. Additionally, applicability of the proposed methods in the determination of target analytes from biological matrices is studied.



# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1. INTRODUCCIÓN

El análisis de compuestos químicos presentes en muestras biológicas o ambientales requiere un procedimiento analítico complejo que implica un paso previo de tratamiento y preparación de la muestra. La etapa de tratamiento de muestra tiene como objetivos, por una parte, minimizar la complejidad de la misma, de manera que sea apta para su análisis mediante la instrumentación analítica habitual, y, por otro lado, eliminar las posibles interferencias presentes en la matriz, favoreciendo así un eficiente “clean-up” [1]. Constituye, por lo general, la etapa más compleja y, en consecuencia, la que mayor tiempo requiere en los procedimientos analíticos. La necesidad de garantizar una recuperación cuantitativa de los analitos o compuestos analizados, evitando pérdidas, así como la naturaleza compleja de la mayoría de matrices biológicas y ambientales, contribuyen a esta consideración. A esto se le suma, además, el elevado consumo de muestra y reactivos, en algunos casos tóxicos, lo que implica que se generen posibles contaminaciones [2, 3].

La mayoría de los avances producidos en la metodología analítica en los últimos años han ido encaminados, por tanto, a solventar en la medida de lo posible estos problemas. En este sentido, la automatización y la miniaturización en la preparación de la muestra constituyen las principales tendencias [4-6]. En el primer caso, el acoplamiento entre la técnica de tratamiento de la muestra y el método de detección posterior permite acelerar el proceso de medida, por lo que se reduce el tiempo de análisis. Asimismo, se incrementan la sensibilidad del método, al minimizar las posibles pérdidas de muestra, y la precisión analítica, al reducir los errores derivados de la manipulación personal. En el caso de la miniaturización, reduciendo la cantidad de muestra se disminuye también el consumo de reactivos y de disolventes caros y tóxicos, contribuyendo así hacia la llamada “Química Verde”.

## 1.1. Técnicas de extracción

La mayoría de los procedimientos de tratamiento de muestra generalmente implican una extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) o una extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE).

La LLE es una de las técnicas convencionales más empleadas tradicionalmente en el tratamiento de muestras líquidas debido a su versatilidad y simplicidad instrumental. Sin embargo, presenta numerosos inconvenientes, como son el elevado tiempo de análisis que requiere, la dificultad de acoplamiento con los equipos de medida analíticos de uso habitual, el elevado consumo de disolventes orgánicos potencialmente peligrosos, lo que supone un grave problema medioambiental, y, en general, una baja selectividad.

En la década de los 70, la extracción en fase sólida (SPE) surge como una alternativa a la LLE. La SPE consiste en un cartucho desechable relleno de un material absorbente con el que interaccionan los analitos en función de su afinidad, por lo que podría considerarse una versión miniaturizada de la cromatografía líquida clásica. Supuso un gran avance con respecto a las técnicas empleadas anteriormente, pues entre otras ventajas permitía aumentar la selectividad y las posibilidades de automatización con el uso de una instrumentación sencilla. Sin embargo, entre sus principales limitaciones se encuentra una limitada capacidad de absorción, el desplazamiento del analito y la oclusión del cartucho con el uso de muestras sucias [1-2, 7]. Por otra parte, pese a reducir la cantidad de disolvente orgánico empleado en comparación con la LLE, requiere elevadas cantidades de muestra, lo que supone un problema, por ejemplo, para el análisis de muestras biológicas, donde la cantidad de muestra es muy limitada.

Así, con el objetivo de minimizar algunas de estas limitaciones y teniendo en consideración las tendencias de miniaturización, se propusieron una serie de métodos de microextracción como alternativa a los métodos clásicos. En 1990 Arthur y Pawliszyn [8] desarrollaron la técnica de



microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction*, SPME). Desde entonces, esta técnica ha sido aplicada en numerosos campos analíticos, como en análisis medioambientales, alimentarios o bioanálisis, entre otros [9-16]. La SPME se basa en el equilibrio de los analitos presentes en la muestra y una fibra metálica o de sílice fundida recubierta de un material de absorción apropiado [17-19]. Entre los revestimientos más empleados destacan divinilbenceno (DVB), polidimetilsiloxano (PDMS), carboxeno (CAR), polietilenglicol (PEG) y Carbowax (CW) en diferentes espesores y combinaciones, siendo el PDMS el más comúnmente usado [20, 21]. Asimismo, también se han combinado materiales polares y no polares para la separación y enriquecimiento de mezclas de compuestos con un amplio rango de polaridad, como por ejemplo éteres o alcoholes.

La SPME es una de las técnicas de preparación de muestras más ampliamente usadas en la separación y/o preconcentración de un amplio rango de analitos con el empleo de una mínima cantidad de disolventes, por lo que puede considerarse una técnica “verde”. Entre sus principales ventajas se encuentran la reducción de los tiempos de análisis, minimizando costes y consumo de disolventes, permite el uso de pequeñas cantidades de muestra y proporciona capacidad de automatización, elevada sensibilidad y facilidad de acoplamiento con diferentes técnicas instrumentales como cromatografía líquida (LC), cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) tanto en modo on-line como off-line [17]. Pese a estas ventajas, la SPME presenta algunas limitaciones derivadas de las fibras comerciales, como la escasa selectividad, lo que conduce a un importante efecto matriz y a la presencia de interferencias, la baja estabilidad química, física y térmica, el desprendimiento del revestimiento y un tiempo de vida limitado [19, 20]. Por ello, en los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos para desarrollar nuevos materiales que permitan solventar estos problemas, entre los que se incluyen líquidos iónicos (ILs), inmunosorbentes (ISs), nanopartículas metálicas (NPs), silicatos mesoporosos y nanoporosos,

nanotubos de carbono (CNTs), grafeno, carbón nanoporoso, polímeros de inclusión molecular (MIPs) y revestimientos sol-gel [18, 21].

Se han desarrollado nuevas modalidades de la SPME, como la extracción por absorción sobre barras magnéticas agitadoras (*stir bar sorptive extraction*, SBSE), en la que el revestimiento de PDMS recubría un pequeño imán magnético [22], o la microextracción por sorbentes empaquetados (*microextraction by packed sorbent*, MEPS), donde los cartuchos poliméricos convencionales usados como soporte del sorbente en la SPE son sustituidos por acero inoxidable [1].

Paralelamente, se han ido desarrollando procedimientos alternativos de extracción encaminados al manejo de volúmenes pequeños de líquidos, entre los que destacan aquellos agrupados bajo el nombre genérico de técnicas de microextracción en fase líquida (*liquid phase microextraction*, LPME), una más que interesante alternativa a la SPE. En estos sistemas, los analitos pasan desde una fase donadora a través de una membrana líquida hasta la fase aceptora. Como una mejora a la LLE clásica, la LPME combina la extracción del analito o analitos, la preconcentración y la inyección de la muestra en una única configuración [23]. Estas técnicas miniaturizadas han adquirido una enorme popularidad debido a que los volúmenes de disolvente orgánico empleados son muy pequeños y la manipulación de la muestra es mínima y sencilla. Existen numerosas alternativas diferentes agrupadas bajo esta denominación, aunque pueden considerarse tres categorías principales de LPME, que son la microextracción en gota (*single drop microextraction*, SDME), la microextracción en fase líquida usando fibras huecas (*hollow fiber liquid phase microextraction*, HF-LPME) y la microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME).

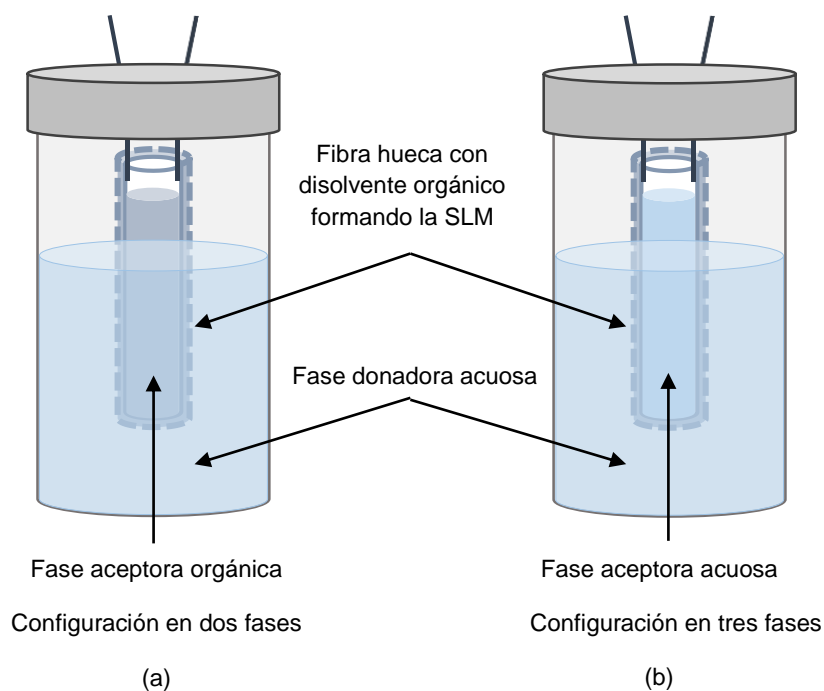
La técnica de SDME constituye la primera modalidad de LPME desarrollada, introducida en 1996 por Jeannot y Cantwell [24], se basa en la distribución de los analitos entre una gota de disolvente orgánico (fase aceptora) y una muestra acuosa (fase donadora). En una primera variante,

la gota de disolvente orgánico estaba suspendida en el seno de la disolución donadora, y, posteriormente, se introdujo una nueva versión en la que la gota se mantenía suspendida en la punta de una aguja de una microjeringa [25, 26]. Se trata de una técnica sencilla y de bajo coste, donde la exposición a disolventes orgánicos tóxicos es mínima y que elimina el efecto memoria, ya que la gota se renueva en cada ciclo de extracción. Sin embargo, el principal problema de la SDME es que la microgota suspendida puede desprenderse fácilmente durante la agitación de la muestra acuosa. Asimismo, no es aplicable a muestras “sucias” ya que las partículas presentes en la misma inestabilizan aún más la gota suspendida y son un peligro potencial para la integridad del instrumento analítico.

Posteriormente, la tecnología se refinó implementando el uso de fibras huecas porosas para la protección de los líquidos extractantes, actuando así como soportes de los mismos, lo que llevó al desarrollo de la técnica de microextracción en fase líquida usando fibras huecas (*hollow fiber liquid phase microextraction*, HF-LMPE) [27-29]. En este tipo de LPME se impregna una fibra hueca, generalmente de polipropileno, con el disolvente orgánico, de manera que éste queda inmovilizado en los poros de la fibra, formando así la membrana líquida soportada (SLM). De esta forma, la muestra no se encuentra en contacto directo con el disolvente extractante, sino que los analitos son extraídos primero desde la muestra acuosa hasta la membrana líquida y después hasta la fase aceptora localizada en el interior de la fibra. Según el número de interfases presentes entre líquidos inmiscibles, se pueden definir dos modalidades de trabajo: en dos o en tres fases (Figura 1.1).

En la configuración en dos fases se emplea el mismo disolvente orgánico tanto para llenar la fibra como para formar la SLM, de manera que el extracto final (fase aceptora) es una fase orgánica compatible con técnicas analíticas como cromatografía de gases, siendo más apropiada para la extracción de analitos hidrofóbicos. En cambio, en la configuración en tres fases, el disolvente orgánico únicamente se encuentra inmovilizado en los

poros de la fibra formando la SLM, de manera que actúa como barrera entre las disoluciones acuosas donadora y aceptora. En este caso, se suele aplicar a la extracción de analitos polares y, dado que el extracto o fase aceptora es de naturaleza acuosa, suele asociarse con técnicas de cromatografía líquida o electroforesis capilar.



**Figura 1.1.** Configuraciones de HF-LPME en dos fases (a) y en tres fases (b).

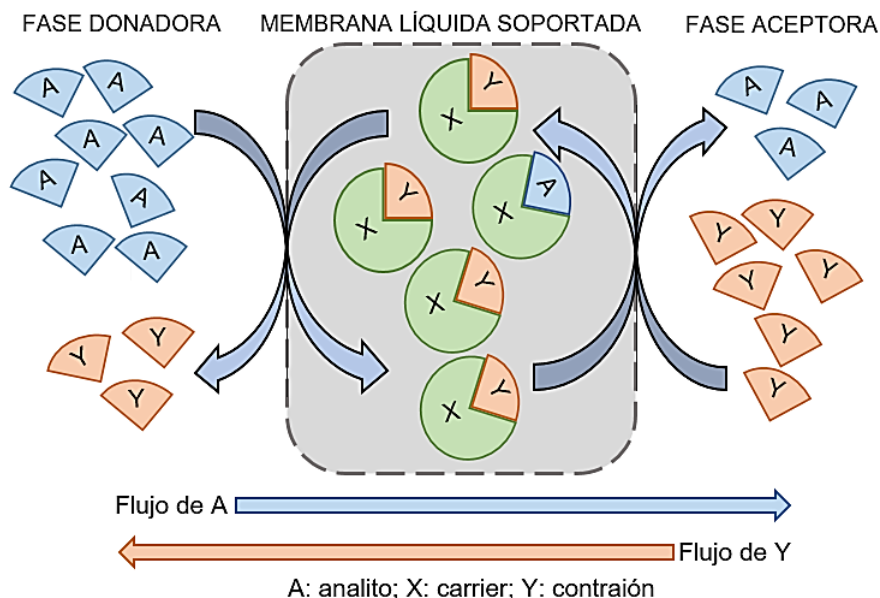
Esta técnica de microextracción tiene numerosas ventajas, como un bajo coste, un eficiente clean-up (incluso en matrices biológicas o medioambientales complejas) una y elevada preconcentración, además de que puede ser fácilmente automatizada. Por otra parte, a diferencia de la SDME, presenta una enorme estabilidad de la membrana líquida, lo que permite que las muestras puedan ser agitadas vigorosamente sin pérdida de la fase orgánica incluso cuando se requieren tiempos y temperaturas superiores. Asimismo, los poros de la fibra proporcionan una gran selectividad, evitando la extracción de moléculas de muy alto peso molecular [11, 23, 30]. Sin embargo, entre sus principales limitaciones se encuentra la

baja velocidad de difusión de los analitos a través de la SLM, lo que implica, generalmente, elevados tiempos de extracción.

Paralelamente, se desarrolló otra modalidad en la que una sustancia auxiliar se añadía tanto en la configuración en dos fases como en la configuración en tres fases con el fin de facilitar el transporte del analito a través la membrana líquida soportada en los poros de la fibra, normalmente por la formación de una molécula neutra o un par iónico. Estas sustancias reciben el nombre de transportadores o “carriers” [31, 32] y permiten mejorar la extracción de una gran variedad de compuestos hidrofílicos con diferentes propiedades. Estas sustancias pueden añadirse bien al disolvente orgánico inmovilizado en los poros de la fibra [33, 34] o a la disolución donadora acuosa donde el analito se encuentra previamente ionizado [35, 36].

En el primer caso (Figura 1.2), se mantiene la neutralidad en la membrana orgánica apolar por la formación de un complejo neutro entre el analito y el carrier que, posteriormente atraviesa la SLM hasta la fase aceptora, donde el analito es intercambiado por el correspondiente contraión (configuración en tres fases) o permanece directamente como par iónico (configuración en dos fases). Así, los analitos catiónicos se extraen con carriers aniónicos y viceversa. En el segundo, se genera un par iónico hidrofóbico en la fase donadora que atraviesa la SLM hasta la fase aceptora donde, igualmente, el analito es intercambiado por el contraión o bien migra directamente como especie neutra, en función de que se emplee una configuración en tres o en dos fases, respectivamente. En ambos casos, los contraiones presentes en exceso en la fase aceptora forman un par iónico con el carrier en la superficie de la membrana, por lo que el nuevo complejo neutro formado vuelve a la fase donadora, dando lugar a un ciclo que se repite de forma continua. Es decir, se facilita el transporte del analito inicialmente ionizado en la fase donadora hacia la fase aceptora, al tiempo que se asegura la transferencia de contraiones en la dirección opuesta. Por tanto, la optimización del pH en ambas fases, así como la elección adecuada

del disolvente orgánico inmovilizado en los poros de la fibra y del carrier son fundamentales para que la extracción se lleve a cabo de forma efectiva.



**Figura 1.2.** Esquema del transporte mediado por carriers o transportadores con carrier disuelto en la membrana líquida.

Se han propuesto diferentes tipos de carriers disueltos, tanto en la fase donadora acuosa, como en la fase orgánica [37-39], siendo esta última variante la más extendida [40-42]. Su empleo se basa mayoritariamente en la extracción de compuestos polares, de manera que su adición al disolvente orgánico favorece la transferencia de masa de los mismos [43]. Entre los carriers más empleados se encuentra DEHP (di(2-ethylhexyl) phosphate), carrier aniónico para la extracción de compuestos básicos o cargados positivamente y el Aliquat®336, carrier catiónico para la extracción de analitos ácidos o cargados negativamente.

En 2006, Assadi et al. [44] introdujeron la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) para la preconcentración de analitos orgánicos presentes en matrices acuosas. En esta técnica, se añaden a la muestra acuosa, de forma rápida y simultánea, un disolvente apolar inmiscible con agua (extractante) y un disolvente polar miscible con agua (dispersante), de

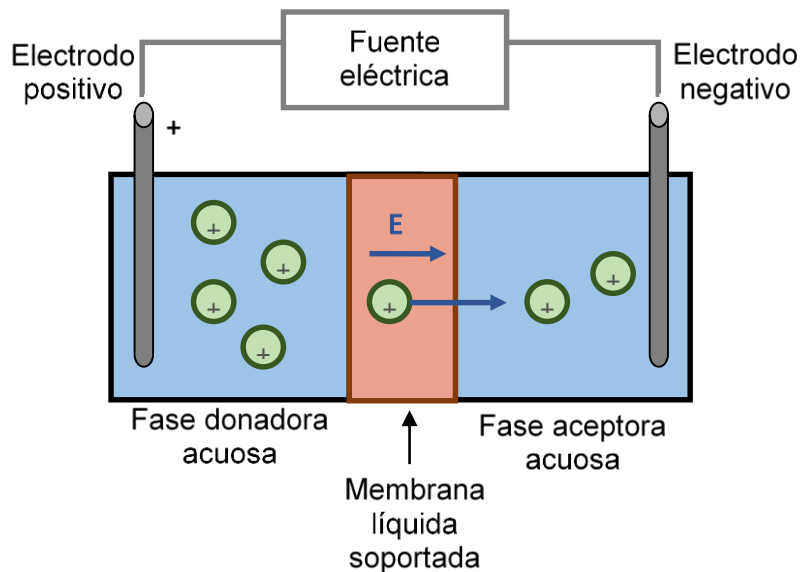
forma que se generan pequeñas gotas de disolvente apolar dispersas en la muestra. A continuación, la mezcla se enfría y se centrifuga a fin de separar las pequeñas partículas de disolvente extractante conteniendo los analitos del resto de la disolución acuosa. De esta forma, se consigue mejorar la eficacia de la extracción al aumentar la superficie de contacto entre la gota y la muestra [45].

Hasta la fecha, el desarrollo de diferentes técnicas de microextracción, así como la mejora de las mismas, ha ido incrementándose de forma continuada, principalmente para mejorar la compatibilidad con los equipos analíticos actuales, evitar el uso de compuestos químicos tóxicos y/o peligrosos y permitir el análisis de muestras de matrices complejas, encontrando así numerosas aplicaciones en un amplio rango de campos analíticos.

Por último, además de las técnicas mencionadas anteriormente, se ha desarrollado también otra modalidad de microextracción en fase líquida (LPME) que, dada su importancia en el desarrollo de esta tesis, se describirá de forma más detallada en la siguiente sección; se trata de la extracción por electromembrana (*electromembrane extraction*, EME).

## **1.2. Extracción por electromembrana (EME)**

La extracción por electromembrana (EME) se introdujo como técnica de preparación de la muestra en 2006 por Pedersen-Bjergaard y Rasmussen [37], quienes propusieron por primera vez el uso de una diferencia de potencial para favorecer la extracción de analitos cargados a través de las membranas líquidas soportadas. Tomando como base la HF-LPME, a migración de los analitos se favorece mediante la aplicación de un campo eléctrico generado por dos electrodos inmersos, uno en la fase donadora y otro en la fase aceptora localizada en el interior de la fibra, ambos conectados a una fuente externa de alimentación que genera corriente continua (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Esquema del procedimiento de extracción por electromembrana (EME) para la extracción de analitos catiónicos.

Esencialmente, el proceso de extracción consiste en que, bajo la influencia del campo eléctrico, los analitos cargados presentes en la muestra migran, atravesando la SLM, hacia el electrodo de carga opuesta localizado en la fase aceptora, donde finalmente quedan atrapados debido a la ionización y a la dirección del campo eléctrico [46]. Por tanto, para que ocurra la migración electrocinética del analito a través de la SLM, éste ha de encontrarse ionizado en ambas fases acuosas, lo cual se consigue mediante el control del pH de ambas disoluciones. La extracción de analitos básicos se lleva a cabo colocando el electrodo positivo en la fase donadora y el negativo en la fase aceptora, por lo que el pH debe tener un valor tal que asegure que los analitos se encuentran cargados positivamente [47-49]. Para analitos ácidos, se invierte la dirección del campo eléctrico, colocando en este caso el electrodo negativo en la fase donadora y el positivo en la aceptora, mientras que el pH debe controlarse para garantizar que los analitos se carguen negativamente [50].

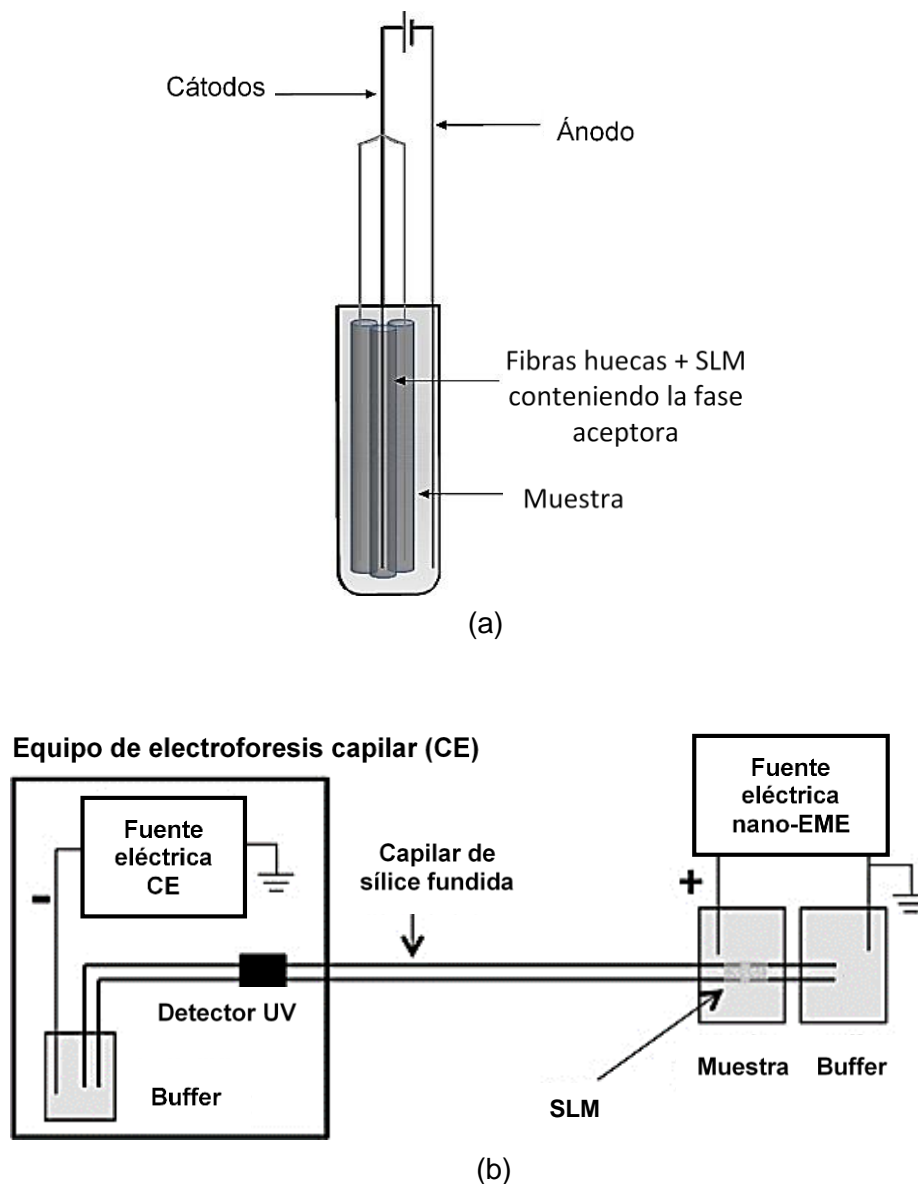
Por tanto, en comparación con los métodos de extracción líquido-líquido (LLE) y extracción en fase sólida (SPE), EME se diferencia



fundamentalmente en dos aspectos. Por un lado, implica un consumo mínimo de disolvente orgánico y, por otro, ofrece la posibilidad única de ajustar la selectividad de la extracción. Ésta puede controlarse fácilmente con la fuente de alimentación externa a través de la dirección y la magnitud del potencial eléctrico. Así, la dirección controla si se extraen cationes o aniones, mientras que la magnitud del potencial eléctrico controla el tipo de compuesto que se extrae, esto es, la selectividad. Asimismo, respecto a HF-LPME, ofrece una mayor flexibilidad y velocidad, reduciendo notablemente el tiempo de extracción. Además, la selectividad de la extracción también puede manipularse por el tipo de disolvente orgánico usado como membrana líquida soportada [51].

La EME permite obtener extractos limpios a partir de matrices complejas, así como elevadas recuperaciones empleando volúmenes de muestra pequeños. Además, dado que los analitos se extraen en una fase aceptora acuosa, esta técnica es directamente compatible con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) y electroforesis capilar (CE).

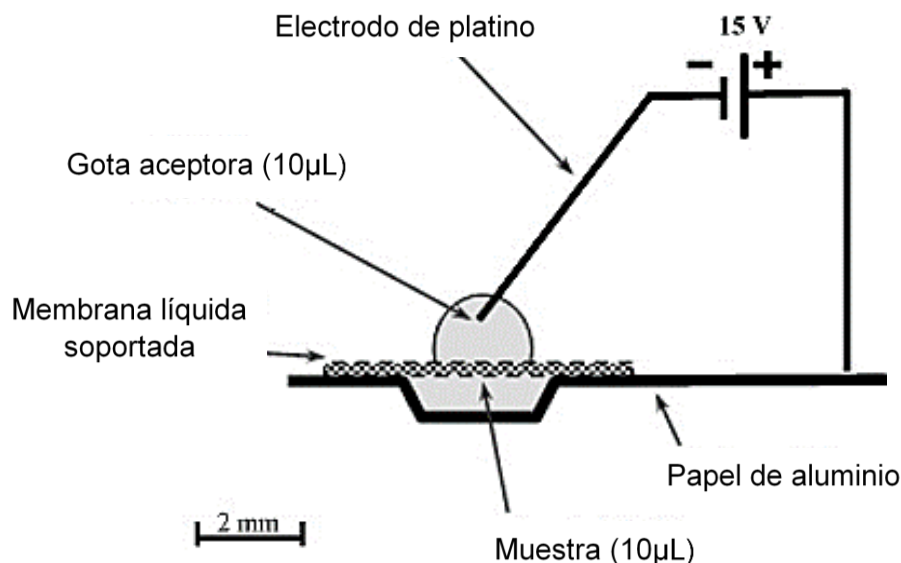
La mayoría de los procedimientos EME empleados hasta la fecha emplean la configuración de fibra hueca descrita anteriormente [52]. Asimismo, se han desarrollado diferentes dispositivos entre los que destaca el uso de múltiples fibras huecas (Figura 1.4a) para la extracción exhaustiva de compuestos básicos en matrices biológicas [53] o para la extracción simultánea de compuestos de diferentes características, como cationes y aniones [54], polares y no polares [55] o ácidos y básicos [56]. La configuración de fibra hueca también se ha empleado en la extracción asistida con un capilar de sílice de electroforesis y conectado on-line a un detector UV-Visible (Figura 1.4b), en lo que se conoce como Nano-EME [57].



**Figura 1.4.** Ejemplos de diferentes dispositivos EME empleados. (a) Múltiples fibras huecas [53]; (b) Nano-EME [57].

Sin embargo, aunque la HF-EME constituya el formato más extendido para procedimientos EME, también se han desarrollado otros dispositivos y modos operacionales. Entre ellos, destaca el uso de membranas planas, lo que supone, desde su introducción en 2008 [58], uno de los principales progresos en el desarrollo de la EME [46]. El uso de membranas planas dio lugar al desarrollo de la microextracción en gota o *drop-to-drop EME* [59]

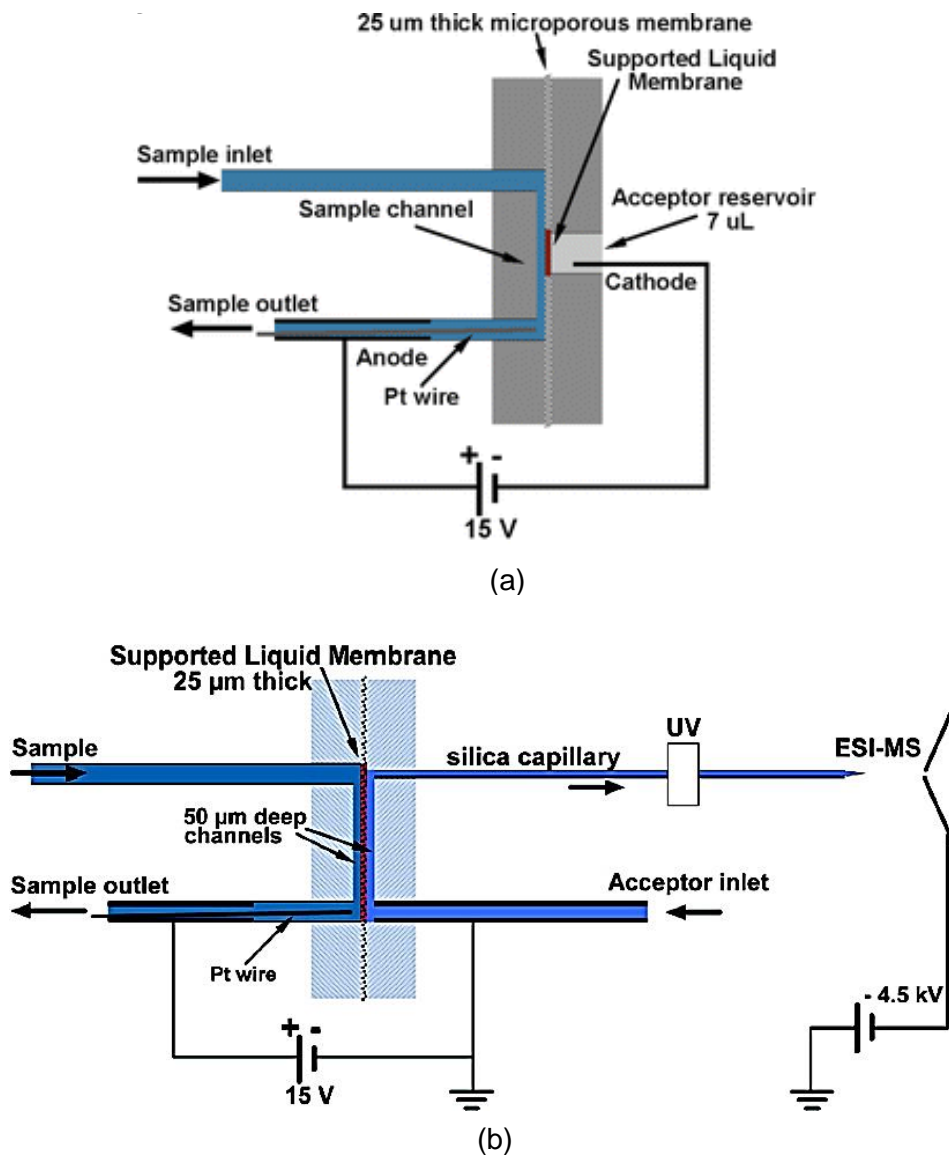
(Figura 1.5), lo que permitía, por primera vez, disminuir la escala hasta tan solo unos pocos microlitros, favoreciendo así una rápida transferencia de masa sin necesidad de agitación. Esta técnica constituye, además, las bases para el posterior desarrollo de procedimientos EME en dispositivos de microfluídica.



**Figura 1.5.** Esquema de microextracción en gota (drop-to-drop) [59].

Así, en el año 2010, Petersen et al., propusieron por primera vez la incorporación de la EME en dispositivos chip, dando lugar a lo que se conoce actualmente como *on-chip EME* [60]. Bajo este concepto, la muestra es impulsada hacia el interior de un pequeño canal (50 µm de profundidad) localizado dentro del chip, en el que los analitos son continuamente extraídos a través de la SLM soportada en los poros de una membrana porosa plana hasta el interior de una disolución aceptora situada al otro lado de la membrana. En una primera variante, este sistema empleaba una fase aceptora estática y una fase donadora dinámica (Figura 1.6a), de manera que la muestra se suministraba continuamente, proporcionando una gran eficacia de extracción. Posteriormente, se desarrolló un sistema de doble flujo (Figura 1.6b), donde tanto la fase aceptora como la donadora se bombeaban constantemente hacia el interior del dispositivo chip, acoplado on-line para la detección directa UV/MS del extracto [61]. La posibilidad de

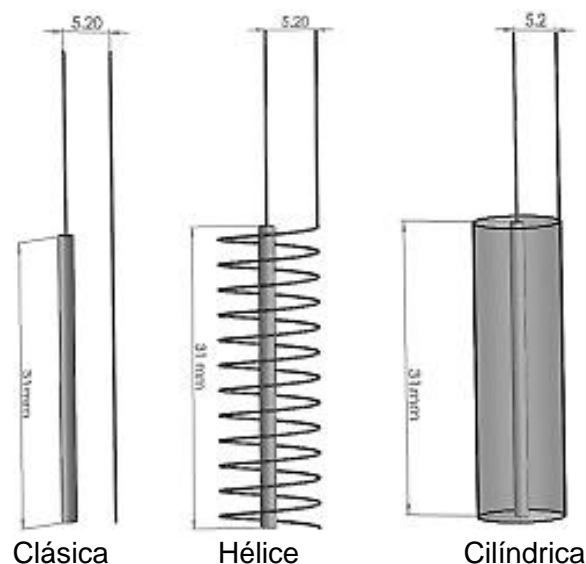
renovar las disoluciones donadora y aceptora durante las extracciones, junto con una transferencia de masa más rápida como consecuencia de que las distancias entre los analitos y la SLM son más pequeñas, hacen de los sistemas on-chip EME una importante como técnica de tratamiento de muestra.



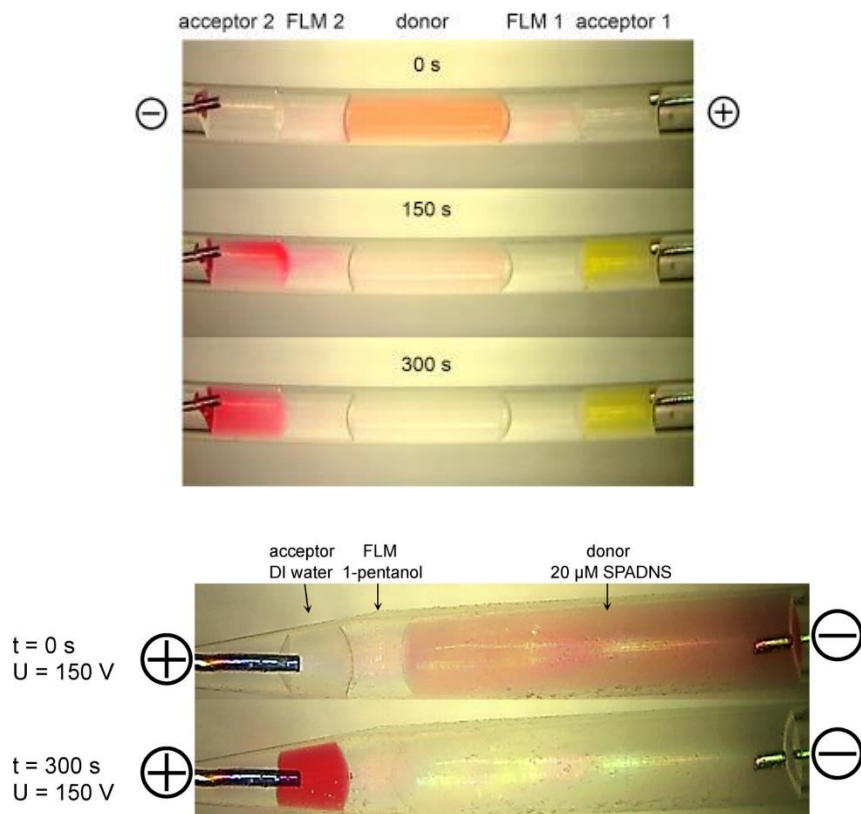
**Figura 1.6.** Esquemas de dispositivos on-chip empleados en EME. (a) fase donadora estática [60]; (b) sistema de doble flujo [61].

Los sistemas de microextracción mediante electromembrana se encuentran en permanente revisión y mejora, y el desarrollo de diferentes modalidades de trabajo crece continuamente. Así, entre algunas de ellas, cabe mencionar la extracción por electromembrana usando pulsos de voltaje (*pulsed electromembrane extraction*, PEME) en lugar de voltaje constante, propuesta para mejorar la estabilidad del sistema y disminuir la resistencia a la transferencia de masa, lo que se traducía en una mejora de la repetibilidad [62]. También se han desarrollado procedimientos EME con voltaje programado (*voltage-step pulsed electromembrane extraction*, VS-PEME) [63], así como manteniendo constante la intensidad de corriente (*constant-current electromembrane extraction*, CC-EME) [64].

Más recientemente, se han desarrollado sistemas EME basados en un campo eléctrico rotatorio [65], así como en el uso de un electrodo rotatorio en la fase aceptora y electrodos con geometría diversa (Figura 1.7) [66, 67]. Por último, cabe destacar el uso de membranas líquidas libres (*free liquid membranes*, FLMs) sin inmovilizar en un soporte poroso (Figura 1.8) [68-70], así como sistemas que permiten la extracción simultánea a través de configuraciones EME acopladas (Figura 1.9) [71-73].

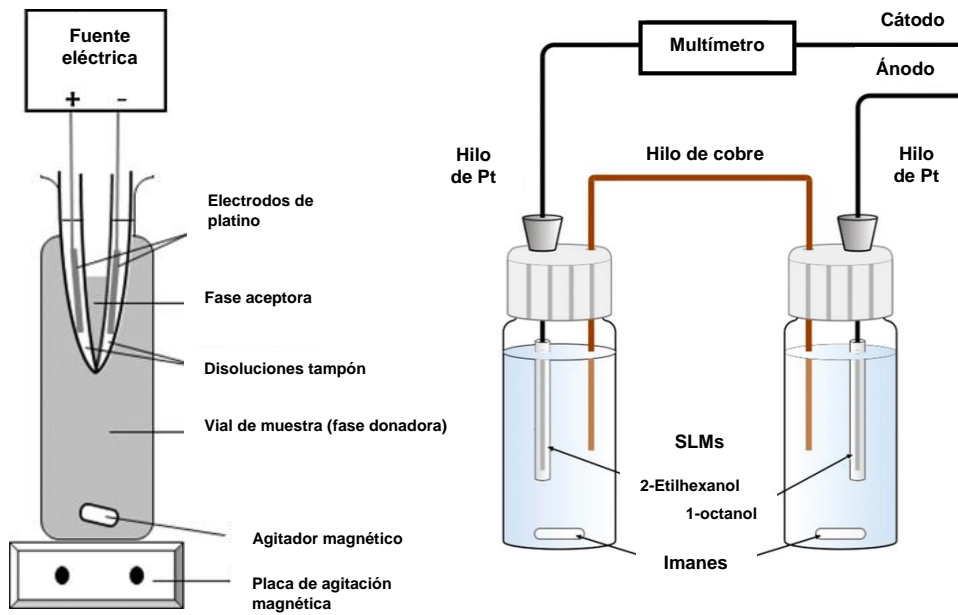


**Figura 1.7.** Ejemplos de diferente geometría de electrodos [67].



**Figura 1.8.** Ejemplos de membranas líquidas empleadas en EME [70, 68].

Desde la introducción de EME en 2006, se han investigado y optimizado varios factores que afectan a la extracción y al enriquecimiento de fármacos básicos [74-76] y ácidos [77], se ha mejorado el conocimiento acerca de los parámetros que afectan a la eficiencia de la extracción y se ha desarrollado una importante base teórica para comprender en profundidad dicho proceso. Por tanto, a pesar de ser un procedimiento que se encuentra aún en un estado incipiente de desarrollo, se puede considerar que tiene un futuro prometedor, ya que mantiene las ventajas de la HF-LPME en cuanto a preconcentración y “clean-up”, aportando además una disminución del tiempo de extracción y un importante control en la selectividad de la extracción.



Dispositivo de extracción por electromembrana dual

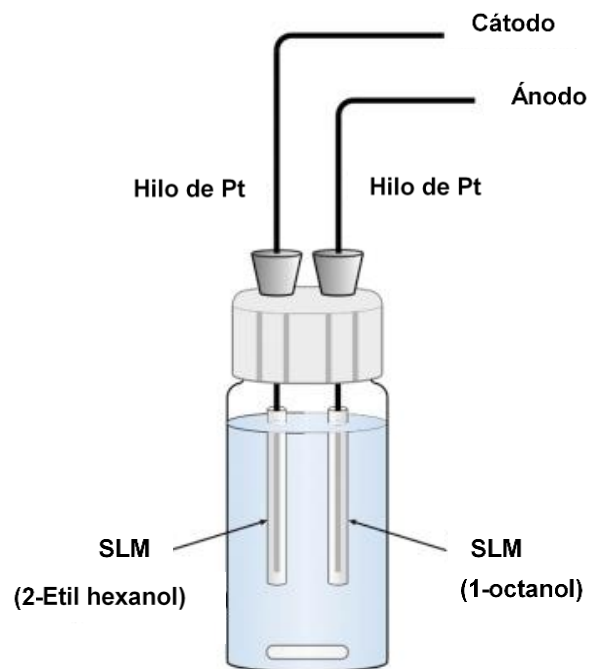


Figura 1.9. Sistemas de electromembrana para la extracción dual simultánea [71-73].

### 1.2.1. Evaluación del rendimiento de la extracción

La eficacia del proceso de extracción se determina en función de la concentración de analito presente en la fase aceptora una vez finalizada la misma. De tal manera que, cuanto mayor sea la concentración de analito en la fase aceptora, mayor es la eficacia del proceso de extracción, para concentraciones iniciales de analito en la fase donadora idénticas. Asimismo, la concentración de analito en la fase aceptora se determina, en este caso, a partir del análisis cromatográfico de los extractos obtenidos.

Los parámetros empleados para determinar la eficacia del procedimiento de extracción son el porcentaje de recuperación (%R) y el factor de enriquecimiento (EF).

La recuperación se define como la fracción de analito  $i$  presente en la muestra que es transferida a la fase aceptora y se calcula, para cada uno de los analitos  $i$ , según la siguiente ecuación (Ecuación 1).

$$R_i (\%) = \frac{n_{a_i}}{n_{s_i}} \cdot 100\% = \frac{V_a \cdot C_{a_i}}{V_s \cdot C_{s_i}} \cdot 100\% \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde  $n_{a_i}$  es la cantidad de analito,  $i$ , transferida a la fase aceptora y  $n_{s_i}$  es la cantidad de analito,  $i$ , presente originalmente en la muestra.  $V_s$  y  $V_a$  son los volúmenes de las fases donadora y aceptora, respectivamente, mientras que  $C_{s_i}$  y  $C_{a_i}$  son las concentraciones de analito,  $i$ , presentes en las fases donadora y aceptora, respectivamente.

Por otra parte, el factor de enriquecimiento (EF <sub>$i$</sub> ) para cada analito  $i$  se calcula según la siguiente ecuación (Ecuación 2).

$$EF_i = \frac{C_{a_i}}{C_{s_i}} = R_i \cdot \frac{V_s}{V_a} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde, la concentración de analito  $i$  en la fase aceptora,  $C_{a_i}$ , se estima a partir las rectas de calibrado obtenidas en los análisis cromatográficos mediante HPLC-UV.



### 1.2.2. *Parámetros operacionales que influyen en el procedimiento EME*

Teniendo en cuenta el fundamento operacional de los procedimientos EME, resulta evidente que la eficacia y rendimiento de los mismos van a verse afectados por numerosos factores. Así, a fin de controlar el flujo de analitos hacia la fase aceptora a través de la membrana líquida, resulta fundamental la elección del pH apropiado, el empleo de un disolvente que sea adecuado para el tipo de analito que se quiere extraer y que, además, permita el paso de la corriente, además de la agitación constante y vigorosa en todo el sistema. Por otro lado, el voltaje aplicado es uno de los parámetros más importantes en la extracción por electromembranas ya que de él va a depender en gran medida la transferencia de masa del analito y la selectividad del sistema.

#### 1.2.2a. Membrana líquida soportada (SLM)

La composición de la SLM juega un papel fundamental en la eficacia de extracción, pues los procedimientos EME requieren el uso de un disolvente orgánico apropiado que conduzca la corriente eléctrica. El disolvente orgánico ideal para formar la SLM en procedimientos EME debe ser inmiscible con el agua y tener una cierta hidrofobicidad para evitar fugas hacia las fases aceptora y donadora, además de impregnar por completo el soporte de la membrana. Asimismo, debe ser líquido a temperatura ambiente y de baja viscosidad para proporcionar una rápida transferencia de masa de los analitos, tener una gran capacidad para establecer interacciones moleculares con los analitos (como puentes de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo) que permitan su transferencia hacia la SLM y, finalmente, tener un punto de ebullición suficientemente alto para evitar pérdidas por evaporación del disolvente y mantener la estabilidad del sistema [78].

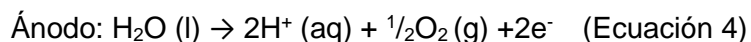
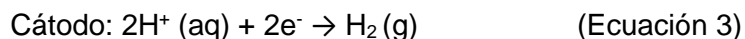
Las características del disolvente orgánico apropiado dependen también de la naturaleza de los analitos que quieran extraerse y pueden estudiarse en términos de sus parámetros solvatocrómicos de Kamlet y Taft  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\pi$  [79, 80]. Así, de acuerdo con la literatura, la extracción por

electromembrana de analitos ácidos requiere disolventes con elevada capacidad de participar en enlaces de hidrógeno como dador (*hydrogen bonding acidity*,  $\alpha$ ) y dipolaridad/polarizabilidad (*dipolarity–polarizability*,  $\pi^*$ ), por lo que los alcoholes de cadena larga suelen ser los disolventes orgánicos más apropiados. En cambio, para la extracción por electromembrana de compuestos básicos, se requiere una elevada capacidad de participar en enlaces de hidrógeno como aceptor (*hydrogen bonding basicity*,  $\beta$ ), siendo el 2-nitrofeniloctil éter (NPOE), sólo o en combinación con algunos aditivos (bis-(2-etilhexil)fosfato (DEHP) o tris-(2-etilhexil)fosfato (TEHP)) los más adecuados [81, 82].

#### 1.2.2b pH de las fases aceptora y donadora

La composición de las fases aceptora y donadora es también de vital importancia en los procedimientos EME. Así, ambas disoluciones deben tener un valor de pH adecuado que asegure que los analitos se encuentren en su forma ionizada, necesaria para que se dé la migración de los mismos bajo la dirección del campo eléctrico aplicado. Como se indicó anteriormente, la extracción de analitos básicos requiere un pH ácido para la fase aceptora, que asegure la protonación de los mismos, de manera que presenten carga positiva. Por el contrario, para la extracción de analitos ácidos, el pH de la fase aceptora debe ser suficientemente alto de manera que los compuestos se encuentren en su forma desprotonada, es decir, cargados negativamente. Según la literatura, la adición de HCl o NaOH en la fase aceptora para la extracción de compuestos básicos o ácidos, respectivamente, mejora la eficacia de extracción debido a que aumenta la liberación de analitos en la interfase entre la SLM y la fase aceptora [83].

Sin embargo, existen algunas limitaciones en el uso de ácidos y bases fuertes para ajustar el pH de las disoluciones aceptora y donadora. Como consecuencia de la diferencia de potencial aplicado, se produce la electrolisis del agua en los electrodos localizados en las fases donadora y aceptora, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:



Atendiendo a las ecuaciones anteriores (Ec. 3 y 4), es lógico pensar que puedan producirse cambios de pH en las disoluciones aceptora y donadora durante el proceso de extracción, aumentando su valor en el cátodo y disminuyendo en el ánodo, lo que, en función de la magnitud en que se produzca, puede afectar negativamente a la eficacia de la extracción [84]. Estos cambios de pH pueden minimizarse con el uso de disoluciones tampón en las fases aceptora y donadora, de manera que el pH de ambas disoluciones se mantenga prácticamente constante durante todo el procedimiento EME [85, 86].

#### 1.2.2c. Voltaje

Otra variable experimental que influye considerablemente en el procedimiento de extracción es el voltaje aplicado a través de la SLM, pues la transferencia de masa a través de la misma depende mayoritariamente del campo eléctrico suministrado. Así, el voltaje de extracción puede afectar a la selectividad, a la eficiencia y a la estabilidad del sistema EME [78]. Generalmente, el flujo de analitos a través de la SLM aumenta al aumentar el voltaje, por lo que voltajes elevados favorecen la extracción de los mismos. Sin embargo, al aumentar el voltaje, la intensidad de corriente generada también aumenta, lo que puede ocasionar problemas, como calentamientos que provoquen la evaporación de la SLM o perforaciones en el soporte, formación de burbujas o una importante electrolisis. Todo ello puede conducir a una menor eficacia y rendimiento de extracción, así como a la obtención de resultados no reproducibles [83, 84]. Por tanto, el voltaje de extracción es un parámetro que debe optimizarse cuidadosamente a fin de obtener la máxima eficacia de extracción posible sin sacrificar la estabilidad del sistema.

#### 1.2.2d. Agitación

Asimismo, se ha demostrado que la eficacia de la extracción aumenta con la velocidad de agitación siempre que no implique la formación de vórtices en la disolución donadora, al disminuir la doble capa generada alrededor de la SLM, lo que favorece la transferencia de masa de los analitos a través de la misma [46].

#### 1.2.2e. Tiempo

Por último, el tiempo de extracción es otro parámetro a tener en cuenta y éste va a depender notablemente del tipo de analitos a extraer, así como del resto de parámetros mencionados anteriormente. En general, la eficacia de la extracción aumenta con el tiempo hasta un cierto punto en el que el sistema entra en estado estacionario. Por otra parte, tiempos excesivamente largos o superiores al óptimo, resultan en un rendimiento de extracción menor debido a la retro-extracción de los analitos hacia la fase donadora como consecuencia del cambio de pH ocasionado en la fase aceptora y otros fenómenos no deseados [78, 84].

### 1.3. Soportes tradicionales en EME y alternativas recientes

Desde su aparición, el material más comúnmente empleado como soporte de la membrana líquida en las aplicaciones de extracción por electromembrana ha sido, fundamentalmente, el polipropileno, bien como fibras huecas o como membranas planas. En el primer caso, las fibras Accurel® PP Q 3 /2 (diámetro interno 600 µm, espesor de pared 200 µm y tamaño de poro 0.2 µm), así como las S6/2 (1800 µm de diámetro interno, 450 µm de espesor y 0.2 µm de tamaño de poro) de la firma alemana Membrana (Wuppertal, Alemania), han sido las más empleadas [87-91]. No obstante, también se han publicado, aunque en menor medida, trabajos que emplean otros materiales como el difluoruro de polivinilideno o el poliacrilonitrilo. En lo que respecta a las membranas planas, el material

usado hasta el momento ha sido siempre polipropileno, aunque en diferentes configuraciones de dispositivo [58-60, 71, 92-99].

A pesar de las evidentes ventajas que exhibe la técnica EME, este procedimiento presenta algunos inconvenientes, relacionados, en gran medida, con el tipo de material empleado como soporte. Así, la baja conductividad eléctrica de las fibras de polipropileno, que como se indicó anteriormente son las más empleadas, limita sobremanera los posibles disolventes orgánicos a usar como membrana líquida soportada, ya que disolventes poco polares cortan, en estas condiciones, la corriente eléctrica, limitándose en gran medida las posibles combinaciones “solubilidad-transporte electrocinético”. Asimismo, estos soportes no exhiben funcionalidad alguna, al tratarse de polímeros orgánicos comerciales carentes de grupos funcionales.

Hasta la fecha, el material empleado como soporte actúa en casi todos los casos exclusivamente desde un punto de vista físico, es decir, como mero soporte poroso del disolvente orgánico usado como membrana líquida, y en su elección, han de considerarse, además, su adecuación a las condiciones concretas de la extracción a realizar, esto implica factores como su compatibilidad con el disolvente orgánico, porosidad o resistencia a la conductividad eléctrica, entre otros. De este modo, su participación en los procesos de extracción que nos ocupan es puramente pasiva. No obstante, han sido descritos algunos sistemas de LPME y EME en los que la SLM y, en algún caso, el propio soporte han sido modificados con la adición de “agentes activos”.

Recientemente se han propuesto e implementado nuevos soportes para la membrana líquida o la modificación de los ya existentes como alternativas a los soportes tradicionales de polipropileno. En este sentido, cabe destacar el uso de fibras huecas de polipropileno decoradas con nanopartículas de plata para la extracción por electromembrana de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [100], lo que permitió una mejor eficacia de extracción que la observada cuando se empleaba la fibra sin la

presencia de nanopartículas. Asimismo, se han empleado fibras huecas de polipropileno reforzadas con nanotubos de carbono (CNTs) para la determinación de compuestos ácidos en muestras biológicas y de aguas residuales [101], así como para la determinación de compuestos básicos en muestras de orina humana [102]. En este caso, el proceso de extracción se puede considerar una combinación de SPME y EME. Por otra parte, se han empleado membranas de inclusión polimérica en formato de fibra (*hollow polymer inclusion membrane*, HPIM) para la EME de compuestos básicos en muestras de plasma humano [103].

Sin embargo, el uso de materiales diferentes al polipropileno en procedimientos de extracción por electromembrana es aún muy limitado y el desarrollo de nuevos soportes alternativos se encuentra en un estado inicial, constituyendo así una nueva línea para investigaciones futuras.

En este contexto, en la presente memoria de tesis se proponen, por primera vez, nuevos soportes para membranas líquidas, con participación activa en procedimientos EME, como alternativas reales y prometedoras a los soportes de polipropileno tradicionales. Se trata de soportes de fácil manipulación tanto química como físicamente, así como fácilmente funcionalizables. Se pretende que estos materiales tengan un papel activo en el procedimiento de extracción, participando mediante diferentes mecanismos en función de su naturaleza y el sistema de extracción en el que se aplique, de manera que la presencia de determinados grupos funcionales en la estructura química del soporte cree interacciones con los analitos que favorezcan, e incluso posibiliten, la extracción de ciertas especies. Con este fin, se han desarrollado e implementado cuatro materiales diferentes: films de agar con nanopartículas de plata, tejidos nanoestructurados Tiss-OH®, membranas de inclusión polimérica (*polymer inclusion membranes*, PIMs) y membranas de quitosano, cada uno de los cuales se describen detalladamente en la correspondiente sección de la memoria.

## REFERENCIAS

- [1] B.H. Fumes, M.R. Silva, F.N. Andrade, C.E.D. Nazario, F.M. Lanças, Recent advances and future trends in new materials for sample preparation, *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 71 (2015) 9-25.
- [2] O. Filippou, D. Bitas, V. Samanidou, Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis, *J. Chromatogr. B*, 1043 (2017) 44-62.
- [3] M. Sajid, J. Płotka-Wasyłka, Combined extraction and microextraction techniques: recent trends and future perspectives, *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 103 (2018) 74-86.
- [4] H.L. Lord, E. A. Pfannkoch, Sample preparation automation for GC injection, *Compr. Sampl. Sample Prep.* 2 (2012) 597–612.
- [5] J.L. Pan, C.J. Zhang, Z.M. Zhang, G.K. Li, Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta*, 815 (2014) 1-15.
- [6] C. Ribeiro, A.R. Ribeiro, A.S. Maia, V.M.F. Gonçalves, M.E. Tiritan, New trends in sample preparation techniques for environmental analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem*, 44 (2014) 142-185.
- [7] V. Pérez-Fernández, L. Mainero Rocca, P. Tomai, S. Fanali, A. Gentili, Recent advancements and future trends in environmental analysis: sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 983 (2017) 9-41.
- [8] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145-2148.
- [9] J. A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. A. Bello-López, M. Ramos-Payán, New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Anal. Chim. Acta* 905 (2016) 8-23.
- [10] S. Balasubramanian, S. Panigrahi, Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review, *Food Bioprocess Technol.* 4 (2011) 1-26.
- [11] D. Han, K.H. Row, Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples, *Microchim. Acta* 176 (2012) 1-22.
- [12] S. Merkle, K.K. Kleeberg, J. Fritsche, Recent developments and applications of solid phase microextraction (Spme) in food and environmental analysis — a review, *Chromatography 2* (2015) 293-381.

- [13] J. Li, Y.B. Wang, K.Y. Li, Y.Q. Cao, S. Wu, L. Wu, Advances in different configurations of solid-phase microextraction and their applications in food and environmental analysis, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 141-152.
- [14] E.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.
- [15] E.A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 249-274.
- [16] E.A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, E. Boyacı, B.J. Bojko, Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 236-248.
- [17] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Miniaturized solid-phase extraction techniques, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 19–38.
- [18] J. Namieśnik, A. Spietelun, Ł. Marcinkowski, Green sample preparation techniques for chromatographic determination of small organic compounds, *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 6 (2015) 215–219.
- [19] A. Amiri, Solid-phase microextraction-based sol-gel technique, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 75 (2016) 57–74.
- [20] E.A. Souza Silva, S. Risticivic, J. Pawliszyn, Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 24–36.
- [21] A. Spietelun, M.M. Pilarczyk, A. Kloskowski, J. Namieśnik, Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibrecoatings, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4524–4537.
- [22] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [23] M.A. Farajzadeh, S.M. Sorouraddin, M.R.A. Mogaddam, Liquid phase microextraction of pesticides: a review on current methods, *Microchim. Acta* 181 (2014) 829–851.
- [24] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236-2240.



- [25] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235-239.
- [26] Y. He, H.K. Lee, Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using conventional microsyringe, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634-4640.
- [27] G. Audunsson, Aqueous/aqueous extraction by means of a liquid membrane for sample cleanup and preconcentration of amines in a flow system, *Anal. Chem.* 58 (1986) 2714-2723.
- [28] E. Thordarson, S. Pálmarsdóttir, L. Mathiasson, J. Å. Jönsson, Sample preparation using a miniaturized supported liquid membrane device connected on-line to packed capillary liquid chromatography, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2559-2563.
- [29] S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650-2656.
- [30] M. Asensio-Ramos, L.M. Ravelo-Pérez, M.Á. González-Curbelo, J. Hernández-Borges, Liquid phase microextraction applications in foodanalysis, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7415–7437
- [31] T.S. Ho, T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 61-72.
- [32] P. Wiczorek, J. Å. Jönsson, L. Mathiasson, Concentration of amino acids using supported liquid membranes with di-2-ethylhexyl phosphoric acid as a carrier, *Anal. Chim. Acta*, 346 (1997) 191-197.
- [33] C. Fontas, M. Hidalgo, V. Salvado, E. Antico, Selective recovery and preconcentration of mercury with a benzoylthiourea-solid supported liquid membrane system, *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 255-261.

- [34] R. Romero, J. Liu, P. Mayer, J.Å. Jönsson, Equilibrium sampling through membranes of freely dissolved copper concentrations with selective hollow fiber membranes and the spectrophotometric detection of a metal stripping agent, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7605-7611.
- [35] K.E. Kramer, A.R.J. Andrews, Screening method for 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization, *J. Chromatogr. B* 760 (2001) 27-36.
- [36] T.S. Ho, J.L.E. Reubsaet, H.S. Anthonsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport combined with liquid chromatography–mass spectrometry: new concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 29-36.
- [37] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes, New concept for rapid sample preparation of biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 183-190.
- [38] Y. Yamini, A. Pourali, S. Seidi, M. Rezazadeh, Electromembrane extraction followed by high performance liquid chromatography: an efficient method for extraction and determination of morphine, oxymorphone, and methylmorphine from urine samples, *Anal. Methods* 6 (2014) 5554-5565.
- [39] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of polar basic drugs from plasma with pure bis(2-ethylhexyl) phosphite as supported liquid membrane, *Anal. Chim. Acta* 934 (2016) 80-87.
- [40] B. Zargar, H. Parham, A. Hatamie, Hollow fiber liquid based microextraction of nalidixic acid in urine samples using Aliquat 336 as a carrier combined with High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016) 257-263.

- [41] H.Y. Kim, S.H. Yoon, T.Y. Jeong, S. Yu, S.D. Kim, Determination of conjugated estrogens in human urine using carrier-mediated hollow-fiber liquid phase microextraction and LC-MS/MS, *Desalin. Water Treat.* 57 (2016) 16024-16033.
- [42] Y. Wang, Y. Liu, J. Han, L. Wang, T. Chen, L. Ni, Selective extraction and preconcentration of trace lead(II) in medicinal plant-based ionic liquid hollow fiber liquid phase microextraction system using dicyclohexyl-18-crown-6 as membrane carrier, *Anal. Methods* 7 (2015) 2339–2346.
- [43] S. Pedersen-Bjergaard, C. Huang, A. Gjelstad, Electromembrane extraction—recent trends and where to go, *J. Pharm. Anal.* 7 (2017) 141-147.
- [44] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.
- [45] R. Costa, Newly introduced sample preparation techniques: towards miniaturization, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 44 (2014) 299-310.
- [46] C. Huang, Z. Chen, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, X. Shen, Electromembrane extraction, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 95 (2017) 47-56.
- [47] I.J.O. Kjelsen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples, *J. Chromatogr. A* 1180 (2008) 1-9.
- [48] T.M. Middelthon-Bruer, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 753-759.
- [49] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 921-928.

- [50] M. Balchen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 220-225.
- [51] A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Recent developments in electromembrane extraction, *Anal. Methods* 5 (2013) 4549-4557.
- [52] M. Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi, Electrically stimulated liquid-based extraction techniques in bioanalysis, *Bioanalysis* 8 (2016) 815-828.
- [53] L.E.E. Eibak, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Exhaustive electromembrane extraction of some basic drugs from human plasma followed by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 57 (2012) 33-38.
- [54] S. Seidi, Y. Yamini, M. Rezazadeh, A. Esrafil, Low-voltage electrically enhanced microextraction as a novel technique for simultaneous extraction of acidic and basic drugs from biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1243 (2012) 6-13.
- [55] L. Arjomandi-Behzad, Y. Yamini, M. Rezazadeh, Pulsed electromembrane method for simultaneous extraction of drugs with different properties, *Anal. Biochem.* 438 (2013) 136-143.
- [56] M.H. Koruni, H. Tabani, H. Gharari, A.R. Fakhari, An all-in-one electromembrane extraction: development of an electro-membrane extraction method for the simultaneous extraction of acidic and basic drugs with a wide range of polarities, *J. Chromatogr. A* 1361 (2014) 95-99.
- [57] M. Ramos-Payán, B. Li, N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, Nano-electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 785 (2013) 60-66.
- [58] L. Xu, P.C. Hauser, H.K. Lee, Electro membrane isolation of nerve agent degradation products across a supported liquid membrane followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 17-22.

- [59] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Drop-to-drop microextraction across a supported liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1496-1502.
- [60] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, S.T. Foss, D. Snakenborg, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electro membrane extraction, *Microfluid. Nanofluid.* 9 (2010) 881-888.
- [61] N.J. Petersen, S.T. Foss, H. Jensen, S.H. Hansen, C. Skonberg, D. Snakenborg, J.K. Kutter, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electro membrane extraction with online ultraviolet and mass spectrometric detection, *Anal.Chem.* 83 (2011) 44-51.
- [62] M. Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi, A. Esrafil, Pulsed electromembrane extraction: a new concept of electrically enhanced extraction, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 214-218.
- [63] M. Rezazadeh, Y. Yamini, S. Seidi, L. Arjomandi-Behzad, Voltage-step pulsed electromembrane as a novel view of electrical field-induced liquid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 21-28.
- [64] A. Slampova, P. Kuban, P. Bocek, Electromembrane extraction using stabilized constant d.c. electric current as a simple tool for improvement of extraction performance, *J. Chromatogr. A* 1234 (2012) 32-37.
- [65] S.S. Hosseiny Davarani, H.R. Moazami, E. Memarian, S. Nojavan, Electromembrane extraction through a virtually rotating supported liquid membrane, *Electrophoresis* 37 (2016) 339-346.
- [66] S. Asadi, H. Tabani, K. Khodaei, F. Asadian, S. Nojavan, Rotating electrode in electro membrane extraction: a new and efficient methodology to increase analyte mass transfer, *RSC Adv.* 6 (2016) 101869-101879.
- [67] H.R. Moazami, S.S. Hosseiny Davarani, J. Mohammadi, S. Nojavan, M. Abrari, The effect of electric field geometry on the performance of

electromembrane extraction systems: footprints of a third driving force along with migration and diffusion, *Anal. Chim. Acta* 891 (2015) 151-159.

[68] P. Kuban, P. Bocek, Preconcentration in micro-electromembrane extraction across free liquid membranes, *Anal. Chim. Acta* 848 (2014) 43-50.

[69] P. Kuban, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Micro-electromembrane extraction using multiple free liquid membranes and acceptor solutions - Towards selective extractions of analytes based on their acid-base strength, *Anal. Chim. Acta* 943 (2016) 64-73.

[70] P. Kuban, P. Bocek, Simultaneous micro-electromembrane extractions of anions and cations using multiple free liquid membranes and acceptor solutions, *Anal. Chim. Acta* 908 (2016) 113–120.

[71] C. Basheer, J. Lee, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, H.K. Lee, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs at neutral sample pH: A novel electro-mediated microextraction approach, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6661-6667.

[72] S. Nojavan, S. Asadi, Electromembrane extraction using two separate cells: A new design for simultaneous extraction of acidic and basic compounds, *Electrophoresis* 37 (2016) 587-594.

[73] S. Asadi, S. Nojavan, Two-step voltage dual electromembrane extraction: A new approach to simultaneous extraction of acidic and basic drugs, *Anal. Chim. Acta* 923 (2016) 24-32.

[74] A. Gjelsad, S. Andersen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 38-45.

[75] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 29-34.

- [76] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 104-111.
- [77] J. Peng, J. Liu, X. Hu, G. Jiang, Direct determination of chlorophenols in environmental water samples by hollow fiber supported ionic liquid membrane extraction coupled with high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 165-170.
- [78] C. Huang, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Organic solvents in electromembrane extraction: recent insights, *Rev. Anal. Chem.* 35 (2016) 169-183.
- [79] R.W. Taft, M.J. Kamlet, The solvatochromic comparison method. 2. The alpha-scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 2886-2894.
- [80] A. de Juan, G. Fonrodona, E. Casassas, Solvent classification based on solvatochromic parameters: a comparison with the Snyder approach, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 52-62.
- [81] Y. Yamini, S. Seidi, M. Rezazadeh, Electrical field-induced extraction and separation techniques: promising trends in analytical chemistry-a review, *Anal. Chim. Acta* 814 (2014) 1-22.
- [82] C. Huang, A. Gjelstad, K.F. Seip, H. Jensen, S. Pedersen-Bjergaard, Exhaustive and stable electromembrane extraction of acidic drugs from human plasma, *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 81-87.
- [83] Y.A. Asl, Y. Yamini, S. Seidi, M. Rezazadeh, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs via on-chip electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta* 937 (2016) 61-68.
- [84] C. Huang, H. Jensen, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Mass transfer in electromembrane extraction – the link between theory and experiments, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 188-197.

- [85] A. Šlampová, P. Kubáň, P. Boček, Additional considerations on electrolysis in electromembrane extraction, *J. Chromatogr. A* 1429 (2016) 364-368.
- [86] P. Kubáň, P. Boček, The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extractions: the role of acceptor solution, *J. Chromatogr. A* 1398 (2015) 11-19.
- [87] M.A. Bello-López, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, Analytical applications of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME): a review, *Anal. Lett.* 45 (2012) 804-830.
- [88] A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Recent developments in electromembrane extraction, *Anal. Methods* 5 (2013) 4549-4557.
- [89] V.K. Marothu, M. Gorrepati, R. Vusa, Electromembrane extraction – a novel extraction technique for pharmaceutical, chemical clinical and environmental analysis, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 619-631.
- [90] M. Ramos-Payán, M.A. Bello-López, R. Fernández-Torres, M. Villar-Navarro, M. Callejón-Mochón, Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples, *Talanta* 85 (2011) 394-399.
- [91] M. Ramos-Payán, M. Villar-Navarro, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, M.A. Bello-López, Electromembrane extraction (EME)—an easy, novel and rapid extraction procedure for the HPLC determination of fluoroquinolones in wastewater samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 2575-2584.
- [92] Y. Li, Y. Xiong, J. Fang, L. Wang, Q. Liang, Application of hollow fiber liquid-phase microextraction in identification of oil spill sources, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6155-6161.
- [93] S. Cui, S. Tan, G. Ouyang, J. Pawliszyn, Automated polyvinylidene difluoride hollow fiber liquid-phase microextraction of flunitrazepam in



plasma and urine samples for gas chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2241-2247.

[94] X. Wang, J. Liu, Y. Wang, X. Zhao, L. Gao, D. Xu, Hollow fiber liquid phase microextraction of tramadol from water and biological samples, *Sepu* 24 (2006) 641-644.

[95] Y. Zhu, X. Chen, F. Zheng, X. Bai, Application of three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction for analysis of hydroxybenzoic acids, *Sepu* 27 (2009) 769-775.

[96] J.F. Peng, J.X. Lu, X.L. Hu, J.F. Liu, G.B. Jiang, Determination of atrazine, desethyl atrazine and desisopropyl atrazine in environmental water samples using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction and high performance liquid chromatography, *Microchim. Acta* 158 (2007) 181-186.

[97] J. Lee, F. Khalilian, H. Bagheri, H.K. Lee, Optimization of some experimental parameters in the electro membrane extraction of chlorophenols from seawater, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7687-7693.

[98] M. Ramos-Payán, H. Jensen, N.J. Petersen, S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, Liquid-phase microextraction in a microfluidic-chip – high enrichment and sample clean-up from small sample volumes based on three-phase extraction, *Anal. Chim. Acta* 735 (2012) 46-53.

[99] N.J. Petersen, J.S. Pedersen, N.N. Poulsen, H. Jensen, C. Skonberg, S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electromembrane extraction for monitoring drug metabolism in real time by electrospray ionization mass spectrometry, *Analyst* 137 (2012) 3321-3327.

[100] M. Ramos-Payán, R. Fernández-Torres, J.L. Pérez-Bernal, M. Callejón-Mochón, M.A. Bello-López, A novel approach for electromembrane extraction based on the use of silver nanometallic-decorated hollow fibers, *Anal. Chim. Acta* 849 (2014) 7-11.

[101] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, H. Ahmar, A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using

carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine, breast milk and wastewater samples, *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 1–6.

[102] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, Development and application of carbon nanotubes assisted electromembrane extraction (CNTs/EME) for the determination of buprenorphine as a model of basic drugs from urine samples, *Anal. Chim. Acta* 767 (2013) 75-80.

[103] N.A. Mamat, H.H. See, Development and evaluation of electromembrane extraction across a hollow polymer inclusion membrane, *J. Chromatogr. A* 1406 (2015) 34-39.

## CAPÍTULO 2.

Films de agar con nanopartículas de plata (AgNPs)

---



## SUMMARY

In this section, agar films containing silver nanoparticles (AgNPs) generated in situ are proposed for the first time as supports for liquid membranes in EME procedures. Agar films of 20  $\mu\text{m}$  thickness containing 107.9 mg Ag/g agar were synthesized and characterized by transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM), showing isolated spherical silver nanoparticles of 20-30 nm diameter with homogeneous distribution.

Membranes of different thickness and silver content were evaluated and EME conditions were optimized investigating the influence of the pH of donor and acceptor phases, voltage and time in the extraction of the target analytes.

The nanometallic films were cut and glued to narrow bore glass tubes and used as supports for a dihexyl ether liquid membrane in the electromembrane extraction of five selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): salicylic acid (SAL), ketoprofeno (KTP), naproxen (NAX), diclofenac (DIC) and ibuprofen (IBU). The driving force for the extraction of these analytes into an aqueous acceptor solution was achieved applying a voltage of 50 V during 40 min through two platinum electrodes immersed in both donor and acceptor phases.

The results were compared to those using polypropylene membranes (450  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$  thickness), achieving 10- to 70-fold higher extraction efficiency.



## 2.1. DESCRIPCIÓN DEL SOPORTE

### 2.1.1. Propiedades del agar

El agar-agar, o simplemente agar, es una gelatina vegetal de origen marino que se obtiene de la pared celular de diversas especies de algas rojas de los géneros *Gelidium*, *Eucheama* y *Gracilaria*, donde existe en forma de sales de calcio o como una mezcla de sales de calcio y magnesio.

Químicamente, el agar, de forma similar al almidón es una mezcla heterogénea de dos polisacáridos: agaropectina (fracción no gelificante) y agarosa (fracción gelificante). Aunque ambos polímeros comparten el mismo esqueleto basado en galactosa, la agarosa es un polisacárido neutro, mientras que la agaropectina está fuertemente modificada con grupos laterales ácidos, tales como sulfato y piruvato [1]. La estructura del agar se representa en la Figura 2.1.

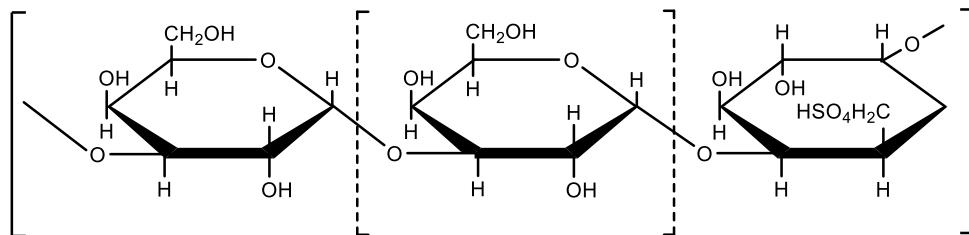


Figura 2.1. Estructura del agar.

Las múltiples aplicaciones del agar se basan, fundamentalmente, en su comportamiento en disolución acuosa [2]. Se trata de un hidrocoloide completamente soluble en agua a altas temperaturas (por encima de los 85°C) capaz de formar geles al enfriarse sin necesidad de alcanzar temperaturas muy bajas (entre 30°C y 45°C), absorbiendo una cantidad de agua de hasta veinte veces su propio peso que proporciona geles muy resistentes.

Su principal uso es como medio de cultivo en microbiología, pues no se metaboliza fácilmente, además de tener una buena resistencia de gel,

elasticidad, claridad y estabilidad, lo que impide que las bacterias patógenas puedan digerirlo.

En la industria alimentaria, se emplea como aditivo alimentario por tratarse de un espesante natural no tóxico, sin ningún sabor y no degradable por ácidos o enzimas proteolíticas presentes en algunas frutas, como en la piña. La capacidad espesante del agar se debe a su poder para hacer que los líquidos se vuelvan más viscosos, produciendo así un efecto gelificante. Estas características lo hacen muy apropiado en la fabricación de conservas de pescado y carne, proporcionándoles una mejor textura. Además, proporciona una capa protectora que impide que los alimentos entren en contacto con las paredes metálicas del interior de los envases, evitando que se dañe su conservación. En el sector de las bebidas, se emplea para purificar y aclarar los líquidos al conseguir que las impurezas se depositen en el fondo. Asimismo, se emplea como estabilizante en sopas, helados o productos lácteos, entre otros.

Por otra parte, encuentra utilidad como laxante gracias a su capacidad de absorber agua y, en consecuencia, aumentar de volumen, lo cual estimula el peristaltismo del intestino, evitando así el estreñimiento.

Asimismo, el agar constituye una matriz de gel ideal para la difusión y el movimiento electrocinético de biopolímeros, además de ser biológicamente inerte y tener propiedades iónicas controladas, por lo que es ampliamente utilizado en biomedicina y biotecnología en técnicas de difusión e inmunodifusión, electroforesis capilar, cromatografía en gel, cromatografía de intercambio iónico y de afinidad o en bioingeniería [3].

Los medios electroforéticos en gel de agar se han utilizado durante muchos años para separar e identificar proteínas del suero y del líquido cefalorraquídeo y otras mezclas biológicas, facilitando el diagnóstico de determinadas enfermedades. Las aplicaciones de separación electroforética usando geles de agar incluyen ácidos nucleicos, lipoproteínas, isoenzimas de deshidrogenasa láctica, glicoproteínas, heparina, proteínas bacterianas, etc.



En cromatografía, son ampliamente usadas columnas de partículas de gel de agarosa, comercializadas bajo los nombres Sepharose® y Bio-Gel® A, como medios para la separación de moléculas de elevado peso molecular, así como para la separación de mezclas artificiales de proteínas y virus.

Por su parte, la aplicación del agar en inmunología es extensa e incluye técnicas como la difusión en gel de agarosa, inmunodifusión radial, inmunoelectroforesis, o electroinmunoensayo, entre otras.

Por último, la agarosa juega un papel importante como vehículo biológicamente inerte al que se enlazan o se introducen enzimas o células, bien durante la formación del gel o por difusión y posterior insolubilización. Así, se emplean perlas de agarosa como bioconvertidores para transformar un producto químico en otro.

Por tanto, el elevado poder de gelificación en medio acuoso, junto con su estabilidad térmica y frente al pH, hacen del agar un polisacárido con numerosas ventajas.

Si un gel de agar sufre una evaporación lenta del disolvente, se pueden generar películas de espesor controlable en función de la cantidad añadida. Estos films de agar son híbridos entre xerogel y aerogel, ya que mantiene una fracción de la estructura tridimensional del sol-gel de partida al ser secado a temperatura ambiente, produciéndose una importante contracción de la estructura. Asimismo, ha de considerarse la existencia de grupos polares en la estructura del xerogel/aerogel debidos a la agarpectina, pudiendo exhibir una funcionalidad química de la que carecen los soportes tradicionales de polipropileno.

Adicionalmente, es posible sintetizar directamente nanopartículas de plata (AgNPs) en un gel de agar [4-6], por lo que podría ser posible obtener un film que las contuviese.

### 2.1.2. Nanopartículas de plata

Actualmente, el interés sobre especies químicas de tamaño nanométrico es una de las áreas de trabajo más importantes de la investigación en química debido, fundamentalmente, a la gran variedad de nuevas propiedades y potenciales aplicaciones que se pueden explotar en diversos campos. En este sentido, una de las unidades básicas de construcción para diversas aplicaciones de la nanotecnología la constituyen las nanopartículas [7].

En los últimos años, las nanoestructuras y nanopartículas han adquirido un interés creciente en el campo de la Química Analítica debido a su particular comportamiento, siendo ampliamente empleadas para aumentar la sensibilidad o selectividad de ciertos procedimientos analíticos. Así, se han descrito aplicaciones analíticas de dispositivos de análisis de tamaño nanométrico, como polímeros de impresión molecular [8], disolventes supramoleculares (líquidos nanoestructurados) [9, 10], nanotubos de carbono [11, 12] y todo tipo de membranas nanoestructuradas [13], entre otros.

Las nanopartículas (NP) son partículas más grandes que los átomos y las moléculas que no obedecen a la química cuántica, ni a las leyes de la física clásica, poseyendo características propias. No existe una definición única de nanopartícula aunque la mayoría de autores piensan que son porciones de materia diferenciadas del medio donde se encuentran y cuya longitud, al menos en una de sus dimensiones está entre 1 y 100 nanómetros [14].

Dentro de este rango los materiales pueden tener propiedades muy diferentes, tanto por un aumento sustancial de la superficie en relación con la masa, como por los efectos cuánticos que tienen lugar en esas dimensiones, lo que lleva a cambios significativos en las propiedades físicas.

Una de las características de las NP es que la relación entre el número de átomos superficiales y el tamaño de la partícula es de carácter

exponencial. En los sistemas nanométricos, las superficies pasan a jugar un papel más importante que el que tenían en los sistemas macroscópicos. Por ello, propiedades relacionadas con la superficie, como las eléctricas, mecánicas, magnéticas, ópticas o químicas son diferentes a las de los mismos materiales a escala no nanométrica [14].

Estas propiedades, están directamente relacionadas con el tamaño y la forma de las nanopartículas, características que, por lo general, se controlan a través del método de preparación. Así, se pueden obtener nanopartículas de muy diversas formas y tamaños, como, por ejemplo, NPs esféricas, nanocables, nanoprismas o nanocubos, entre otras [15, 16].

Es difícil encontrar una única clasificación de las nanopartículas ya que éstas se pueden clasificar atendiendo a un gran número de factores, entre los que cabe destacar su naturaleza química, la morfología, el medio donde se encuentran dispersas, el estado de dispersión y las modificaciones superficiales que puedan tener.

Una clasificación muy general de las nanopartículas es la basada en su origen, donde se pueden encontrar tres grandes categorías. Así, se diferencia entre las nanopartículas de origen natural (biológico, mineral o ambiental), antropogénicas (producidas de forma involuntaria como consecuencia de la actividad humana) y artificiales o manufacturadas (obtenidas deliberadamente mediante las llamadas nanotecnologías). Estas últimas, a su vez, se pueden clasificar según su composición, diferenciándose nanopartículas de carbono, metálicas, dendrímeros y nanocomposites.

De todas las nanopartículas, las basadas en metales o en óxidos metálicos muestran, entre otras, interesantes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas y catalíticas, relacionadas, en general, con su tamaño y forma y que pueden ser interesantes desde el punto de vista de su aplicación práctica [7].

En los últimos años, la plata ha ganado mucho interés debido a su gran estabilidad química, excelente conductividad eléctrica y a su actividad catalítica y antibacteriana [17].

Debido a ello, las nanopartículas de plata (AgNPs) constituyen en la actualidad uno de los nanomateriales más empleados en la industria, presente en al menos 600 productos de consumo, desde textiles o electrodomésticos a bactericidas [18]. Se utilizan en electrónica, ropa, pinturas, cosméticos, bactericidas, biofungicidas, aplicaciones biomédicas, así como en la industria médico-farmacéutica y alimentaria [17].

Así, en el contexto del gran desarrollo que ha experimentado la nanociencia y la nanotecnología en los últimos años, se han desarrollado diferentes métodos físicos y químicos para la obtención de nanopartículas de plata, la mayoría de ellos basados en reacciones de reducción de sales metálicas de plata (I) [7].

Una de las propiedades más importantes de las nanopartículas de plata es su actividad antibacteriana, razón por la que encuentra aplicación en numerosos dispositivos empleados en el ámbito médico. Por otra parte, se ha demostrado que muestran una gran capacidad para controlar procesos inflamatorios, además de emplearse como agente cicatrizante. Asimismo, las nanopartículas de plata se han incorporado también en la industria textil y en el sector alimentario, así como en consumibles diarios o electrodomésticos [7, 17].

Las nanopartículas de plata presentan una elevada conductividad eléctrica, además de propiedades ópticas extraordinarias que permiten variar las propiedades ópticas de otros materiales. Mencionar, por último, una característica importante que presentan las nanopartículas: la posibilidad de ser modificadas superficialmente con objeto de obtener nanopartículas funcionalizadas con moléculas útiles a la aplicación para las que se han diseñado. Las modificaciones más comunes suelen consistir en la adsorción de tensioactivos o ligandos cargados, polímeros, tanto sintéticos como naturales, antígenos, etc. Esta característica pudiera ser de

gran valor en técnicas analíticas de extracción, ya que permitiría obtener soportes más selectivos y específicos para determinados analitos, facilitando así la extracción de los mismos en presencia de otros.

### **2.1.3. Soporte estudiado**

En este capítulo se proponen como soportes de la membrana líquida en procedimientos EME, films de agar con nanopartículas de plata generadas in situ durante la fabricación del gel.

De esta manera, la inclusión de nanopartículas metálicas en los soportes empleados en EME está orientada, por una parte, al aprovechamiento de sus propiedades electrónicas para homogeneizar e incrementar el campo eléctrico a través del soporte de la membrana líquida que, como ya se ha indicado, presenta, en general, muy baja conductividad eléctrica. Por otra parte, se pretende hacer uso de ciertas propiedades como, por ejemplo, la capacidad de las nanopartículas metálicas de interaccionar con determinados grupos funcionales como tioles o aminas.

La combinación de films de agar, un material estable y de fácil preparación, con nanopartículas metálicas pretende dar lugar a un nuevo soporte para sistemas EME que proporcione una ventaja primordial, la mejora de la conductividad eléctrica del sistema, lo que se traduce en un aumento del rendimiento del proceso de extracción.

## **2.2. SÍNTESIS**

Los films de agar con nanopartículas de plata (AgNPs) se prepararon siguiendo el método propuesto por Muthuswamy [19]. De este modo, la síntesis se llevó a cabo disolviendo 0,5 g de agar-agar en 50 ml de agua ultrapura en ebullición y agitación. Seguidamente, esta mezcla se dejó enfriar hasta 50°C y se añadieron 30 ml de etanol y 0,05 g de polivinilpirrolidona (PVP) con agitación constante. Por otro lado, se pesaron cantidades variables de  $\text{AgNO}_3$  (0,043, 0,085 y 0,107 g) que se disolvieron

en 10 ml de agua ultrapura y se adicionaron gota a gota a la disolución anterior. Por último, la disolución resultante se calentó a reflujo durante 2 horas a 90°C en ausencia de luz. Transcurrido dicho periodo de tiempo, la disolución adquiere un color amarillo como consecuencia de las AgNPs formadas, cuya reducción completa se asegura por el exceso de polivinilpirrolidona (PVP), que actúa como agente reductor.

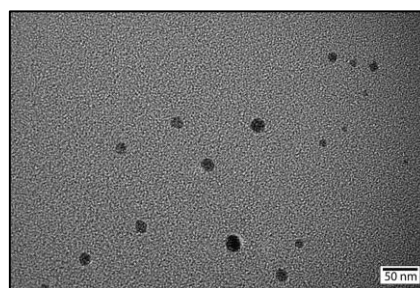
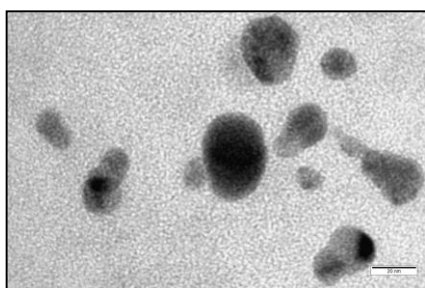
Haciendo uso de esta síntesis, se prepararon diferentes membranas de agar con características variables. Para ello, se vertieron distintos volúmenes de la disolución anterior en placas Petri de 8 cm de diámetro, que se almacenaron posteriormente en la oscuridad a temperatura ambiente hasta que el producto obtenido estuviera completamente seco y pudiera despegarse como una película independiente (unos 3-4 días). Siguiendo este procedimiento se prepararon un total de 12 films de diferente espesor y contenido en plata. El espesor del film se controló con el volumen de disolución vertido en la placa Petri, de manera que, para volúmenes de 5, 10, 20 y 30 ml se obtuvieron films de 20, 25, 30 y 35  $\mu\text{m}$  de espesor, respectivamente, medidos posteriormente por microscopía óptica. Asimismo, el contenido en plata se controló por la cantidad de  $\text{AgNO}_3$  añadida, de manera que para 0,043, 0,085 y 0,107 g de  $\text{AgNO}_3$ , se obtuvieron membranas con un contenido en plata de 55,0, 107,9 y 215,9 mg de Ag/g de agar, respectivamente. Por tanto, como resultado de combinar cada una de las cantidades de  $\text{AgNO}_3$  pesadas con los distintos volúmenes vertidos en las placas de Petri, se obtienen un total de 12 films con características variables.

### **2.3. CARACTERIZACIÓN**

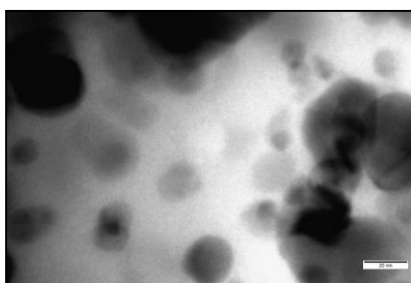
Las nanopartículas de plata generadas "in situ" en los films sintetizados se caracterizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). El estudio se llevó a cabo sumergiendo una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono en la disolución que contiene las AgNPs durante 1 minuto. Posteriormente, la rejilla se dejó secar durante varias

horas en oscuridad y a temperatura ambiente. El análisis de TEM se llevó a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi CM 200 funcionando a 200 KV del servicio de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

La Figura 2.2 muestra las imágenes de TEM para los tres films nanometálicos analizados, todos ellos con un espesor de 20  $\mu\text{m}$ . Puede observarse que en los films con un contenido de 55,0 mg Ag/g de agar (Figura 2.2a), las AgNPs tienen una forma cónica y algunas de ellas parecen estar agrupadas formando aglomerados de alrededor de 50-60 nm. Por otro lado, las AgNPs presentes en los films con un contenido de 107,9 mg de Ag/g de agar (Figura 2.2b) tienen una forma esférica y bien definida, así como un tamaño más pequeño, alrededor de 20-30 nm, sin formar aglomerados. En el caso de los films que contienen 215,9 mg de Ag/g de agar (Figura 2.2c) se observa claramente que las AgNPs son más grandes (alrededor de 60 nm) y prácticamente todas están formando aglomerados.



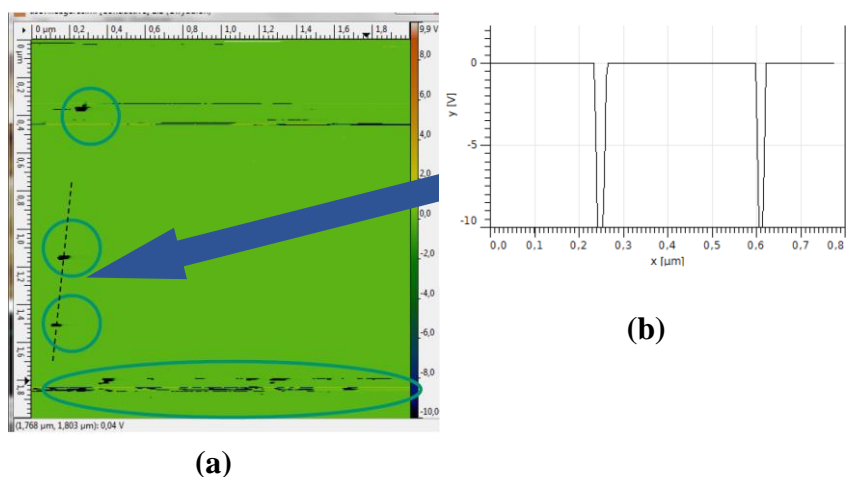
a) AgNPs en el film con 55,0 mg Ag/g agar    b) AgNPs en el film con 107,9 mg Ag/g agar



c) AgNPs en el film con 215,9 mg Ag/g agar

**Figura 2.2.** Imágenes TEM de los films nanometálicos en función de su diferente contenido en plata.

Por otra parte, se obtuvieron los mapas de conductividad de las films nanometálicos mediante Microscopía de Fuerza Atómica, empleándose para estas mediciones un Microscopio de Fuerza Atómica CSI Nano-Observer (Scientec Ibérica SL, Madrid, España) en el modo conductor (C-AFM). En los mapas de conductividad obtenidos en un escáner de 2  $\mu\text{m}$  (Figura 2.3a), se observan regiones de alta conductividad en las zonas donde hay AgNPs presentes, mientras que no se obtiene conductividad en las regiones sin partículas nanometálicas (Figura 2.3b). Asimismo, la anchura de los picos de conductividad es compatible con el tamaño de las AgNPs obtenido a partir de estudios TEM.



**Figura 2.3.** Caracterización del film nanometálico por Microscopía de Fuerza Atómica.

La caracterización de los films mediante microscopía electrónica revela, en primer lugar, que la cantidad de  $\text{AgNO}_3$  añadida durante la síntesis determina no sólo el tamaño de las nanopartículas de plata generadas, sino también la forma de las mismas y que, un aumento de la cantidad de  $\text{AgNO}_3$  no conduce necesariamente a la formación de un número superior de nanopartículas, ya que en este caso, como se ha comprobado, se forman aglomerados de mayor tamaño. En sentido opuesto, una menor cantidad de  $\text{AgNO}_3$  tampoco excluye la formación de aglomerados, de hecho, únicamente los films con un contenido medio de plata (107,9 mg de Ag/g de agar) presentan nanopartículas de plata aisladas y bien definidas.



Asimismo, los mapas de conductividad evidencian que la presencia de AgNPs en los films de agar es fundamental para obtener zonas de elevada conductividad, puesto que en las regiones donde no existen AgNPs no se observa conductividad alguna.

## **2.4. ESTABILIDAD**

Para llevar a cabo el estudio de la estabilidad de los films nanometálicos, éstos se sometieron a diferentes condiciones de luz y temperatura. Así, se analizó la estabilidad de los films a temperaturas de -18°C, -5°C, 5°C, 20°C y 35°C durante 24-48 horas, observándose que los films conservados a -18°C y -5°C no podían utilizarse para el procedimiento de EME debido a que el proceso de descongelación afectaba a las características mecánicas de la membrana de una manera irreversible, produciéndose la desagregación y ruptura de la misma. En cambio, los films conservados a temperaturas entre 5°C y 35°C si resultaban útiles para el procedimiento de extracción.

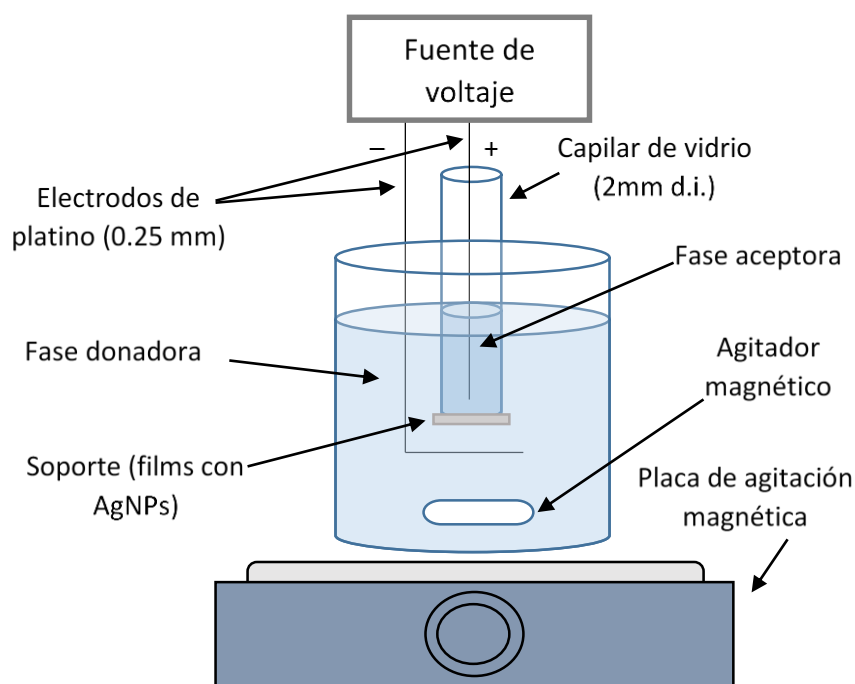
Por otra parte, para analizar la estabilidad frente a la luz, los films fueron expuestos a la luz del día y conservados en la oscuridad. Se observó que los films sometidos a la exposición de la luz durante un período de tiempo de cuatro días experimentaban un proceso de metalización, adquiriendo una apariencia de espejo, no siendo efectivos para ser empleados en el procedimiento EME. Por el contrario, se observó que aquellos que se conservaron en la oscuridad eran óptimos para el procedimiento de extracción y se podían utilizar hasta tres meses después de su síntesis.

Los estudios de estabilidad manifiestan, por tanto, que temperaturas muy bajas (por debajo de 5°C) así como la exposición a la luz solar, afectan a las propiedades de los films, impidiendo, por tanto, su uso en sistemas EME. En consecuencia, las condiciones apropiadas de conservación de los

films implican su almacenamiento en la oscuridad y a temperaturas comprendidas entre 5°C y 35°C.

## 2.5. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

Una vez que los films de agar con nanopartículas de plata están completamente secos, pueden manipularse para su empleo como soporte en EME, lo cual requiere el diseño y la elaboración de un dispositivo experimental adecuado con el que llevar a cabo el procedimiento de extracción, cuyo esquema se representa en la Figura 2.4.



**Figura 2.4.** Dispositivo experimental empleado en el procedimiento EME con films de agar con AgNPs.

Con este fin, los films se despegan de la placa Petri, se cortan en fragmentos de 5 mm x 5 mm, aproximadamente, y se pegan sobre capilares de vidrio de 4 mm de diámetro, 2 mm de diámetro interno y 2.5 cm de longitud usando resina epoxi (Araldit Standard Ceys®, Barcelona, España). El pegado de la membrana se realiza sobre uno de los extremos del capilar

de vidrio, de manera que la base del mismo quede completamente recubierta por el soporte. La membrana sobrante se pega sobre los laterales del capilar, asegurando así el sellado completo. Sobre este soporte se sustenta la membrana líquida, por lo que, a continuación, el capilar de vidrio con el film de agar se impregna en el disolvente orgánico durante 5 segundos, eliminando el exceso con papel. Seguidamente, el capilar de vidrio se llena con la fase aceptora (30  $\mu$ L de agua ultrapura) con la ayuda de una microjeringa y en su interior se coloca un electrodo de platino de 0.25 mm de diámetro, evitando que éste entre en contacto con la superficie interna del film.

A continuación, se introduce el tubo de vidrio en el interior de un vial de 10 mL, que contiene, además de la disolución donadora, otro electrodo de platino (0.25 mm de diámetro) en forma de L, así como un agitador magnético, manteniendo una distancia entre los electrodos de 2 mm. Por último, el sistema se coloca sobre una placa de agitación magnética y los electrodos se conectan a una fuente de corriente continua (VWR International, West Chester, Pensilvania, EEUU) capaz de proporcionar valores de voltaje en el rango de 2-300 V y corrientes entre 4-500 mA.

Una vez que se ha llevado a cabo la extracción, se desconecta la fuente y se recoge la fase aceptora con una microjeringa para su inyección en un equipo de HPLC. El análisis cromatográfico se lleva a cabo empleando las condiciones que se describen en el apartado 2.7.

La optimización del procedimiento de extracción se llevó a cabo analizando la influencia de diferentes factores sobre la eficacia del mismo. Así, se probaron diferentes disolventes para la formación de la membrana líquida soportada, se emplearon films de distinto espesor y contenido en Ag y se aplicaron diversas condiciones de operación con voltajes y tiempos de extracción variables. El procedimiento se aplicó a la microextracción y posterior determinación por HPLC de algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como son: ácido salicílico (SAC), ketoprofeno (KTP), naproxeno (NAX), diclofenaco (DIC) e ibuprofeno (IBU).

## 2.6. COMPUESTOS ESTUDIADOS

Los films de agar con nanopartículas de plata (AgNPs) se emplearon en la determinación de diferentes compuestos con el fin de analizar su aplicabilidad como soporte de la membrana líquida en sistemas de extracción por electromembrana. Se seleccionaron cinco compuestos pertenecientes a la familia de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen un grupo muy diverso de fármacos, químicamente heterogéneo, pero que tienen en común actividades terapéuticas y efectos colaterales. La mayoría de ellos ejercen tres funciones fundamentales: analgésica, antiinflamatoria y antipirética, sin embargo, su uso clínico depende tanto de su eficacia como de su toxicidad relativa [20, 21].

Los antiinflamatorios naturales, segregados por el propio organismo, son los derivados de los corticoides, sustancias de origen esteroideo de potente acción antiinflamatoria pero con importantes efectos secundarios. Por el contrario, el término "no esteroideo" se aplica a los AINEs para recalcar su estructura química no esteroidea y por presentar menos efectos secundarios [22].

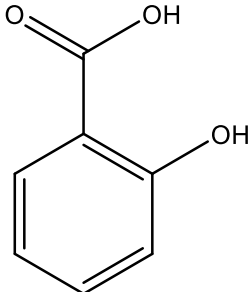
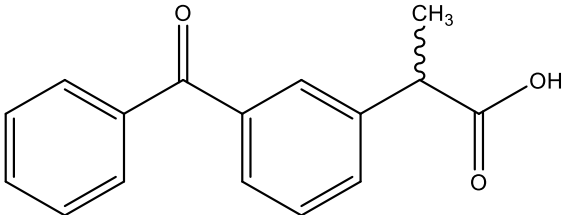
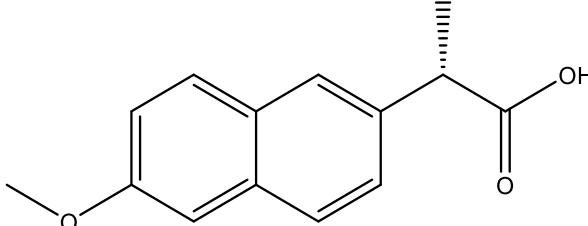
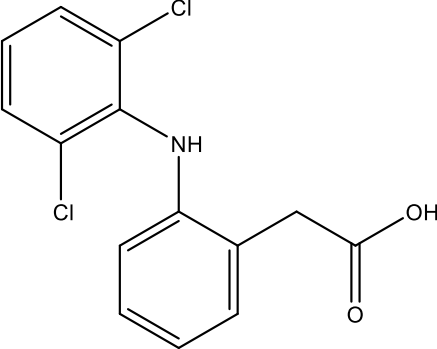
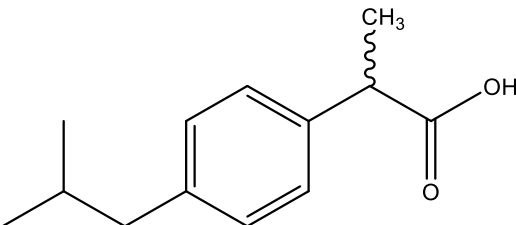
La principal acción terapéutica de todos los AINEs es la inhibición de la actividad de las ciclooxigenasas, enzimas que convierten el ácido araquidónico de las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables. Éstos, a su vez, se transforman en prostaglandinas (PG) y tromboxanos, mediadores de la inflamación y factores biológicos locales no circulantes llamados autacoides, incluyendo los eicosanoides [23].

Por otro lado, forman parte de uno de los principales tratamientos de enfermedades reumáticas en las que la inflamación juega un papel importante, como la artritis reumatoide, la gota o la tendosinovitis, entre otras. Asimismo, por su capacidad de disminuir el dolor, también se utilizan en otros muchos procesos, como son la artrosis, el dolor muscular, el dolor de cabeza y después de traumatismos y de intervenciones quirúrgicas. Por

sus acciones farmacológicas características, con frecuencia se autoprescriben sin control médico, bien como fármacos aislados o asociados, a veces sin base científica, a muchos otros. Todo esto hace que sean uno de los medicamentos más consumidos a nivel mundial y, en consecuencia, son también los más detectados en el medio ambiente, encontrándose presentes en aguas residuales y superficiales [20, 24].

Debido al elevado consumo de antiinflamatorios no esteroideos a nivel mundial, los estudios que se desarrollan en este trabajo se aplican a la extracción y posterior determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución de cinco de estos fármacos de uso común en medicina y veterinaria, que son ácido salicílico (SAL), ketoprofeno (KTP), naproxeno (NAX), diclofenaco (DIC) e ibuprofeno (IBU). Las principales características de estos compuestos, así como su estructura química, se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Estructura y características de los AINEs estudiados.

<p><b>Ácido salicílico</b>  <i>2-Hydroxybenzoic acid</i>  <math>C_7H_6O_3</math>                      PM= 138.122 g/mol                      Número CAS: 69-72-7  <math>pK_a= 2.80</math>  <math>\log P= 2.3</math></p>	
<p><b>Ketoprofeno</b>  <i>2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid</i>  <math>C_{16}H_{14}O_3</math>                      PM= 254.285 g/mol                      Número CAS: 22071-15-4  <math>pK_a= 4.23</math>  <math>\log P= 3.1</math></p>	
<p><b>Naproxeno</b>  <i>(2S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid</i>  <math>C_{14}H_{14}O_3</math>                      PM= 230.263 g/mol                      Número CAS: 22204-53-1  <math>pK_a= 4.84</math>  <math>\log P= 3.3</math></p>	
<p><b>Diclofenaco</b>  <i>2-[2-(2,6-dichloroanilino)phenyl]acetic acid</i>  <math>C_{14}H_{11}Cl_2NO_2</math>                      PM= 296.147 g/mol                      Número CAS: 15307-86-5  <math>pK_a= 4.18</math>  <math>\log P= 4.4</math></p>	
<p><b>Ibuprofeno</b>  <i>2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid</i>  <math>C_{13}H_{18}O_2</math>                      PM= 206.285 g/mol                      Número CAS: 15687-27-1  <math>pK_a= 4.41</math>  <math>\log P= 3.5</math></p>	

Fuente: PubChem.

## 2.7. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

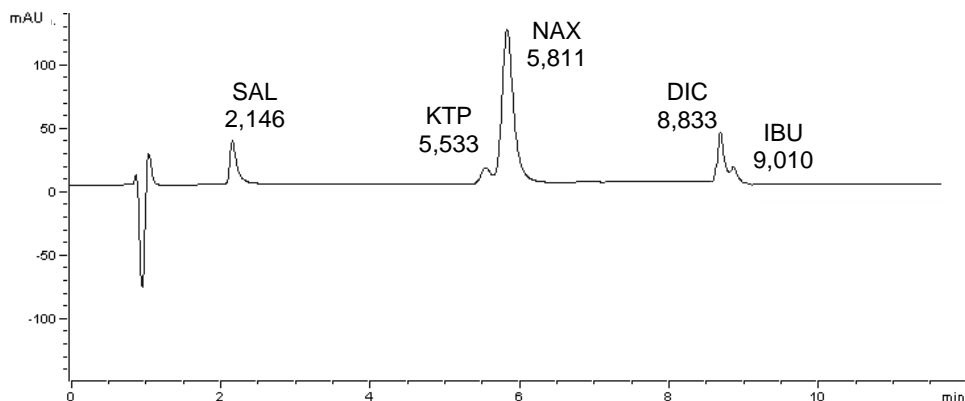
Se llevó a cabo la determinación de los AINEs seleccionados mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta de diodos en fila (HPLC-DAD). Para dicho análisis cromatográfico, se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent-Technologies Serie 1100 (Palo Alto, CA, EEUU) equipado con una bomba cuaternaria, sistema de desgasificación a vacío y compartimento termostatzado de columna. Para la detección, el equipo presenta un detector ultravioleta-visible de diodos en fila (UV-DAD) y un detector de fluorescencia (FL) programable con disposición en línea. El sistema de inyección está constituido por un inyector manual Rheodyne modelo 7725i con un volumen de bucle para la muestra de 10  $\mu\text{L}$ .

Para la separación cromatográfica de los compuestos estudiados se empleó una columna LiChroCART® Purospher® STAR (VWR, Darmstadt, Alemania) de 75 mm de longitud, 4 mm de diámetro interno con fase estacionaria RP-18e y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, con una precolumna Kromasil® 100 Å, C18, 5  $\mu\text{m}$  (15 mmx4.6 mm d.i.) (Scharlab S.L., Barcelona, España). En todos los casos la separación se llevó a cabo a una temperatura constante de 20°C. Como fase móvil se empleó una mezcla de ácido fórmico al 0.1% (v/v) (componente A) y acetonitrilo (componente B) con elución en gradiente a un flujo constante de fase móvil de 0.8 mL min<sup>-1</sup>. En la Tabla 2.2 se muestran las condiciones cromatográficas para la elución en gradiente de los AINEs seleccionados.

**Tabla 2.2.** Condiciones cromatográficas para la elución en gradiente de los AINEs seleccionados. A: ácido fórmico 0.1% (v/v), B: Acetonitrilo (ACN).

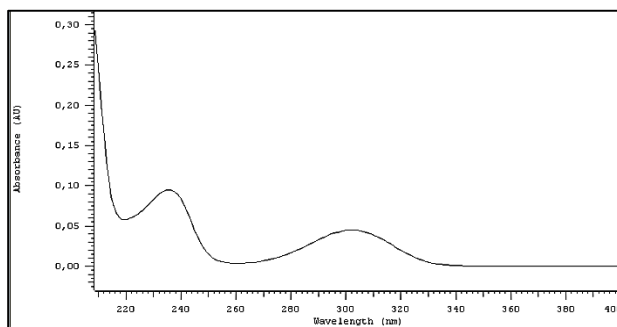
Tiempo (min)	% A	% B
0	60	40
5	60	40
10	0	100
12	0	100

En la Figura 2.5, se muestra el cromatograma obtenido haciendo uso del método de separación anterior.



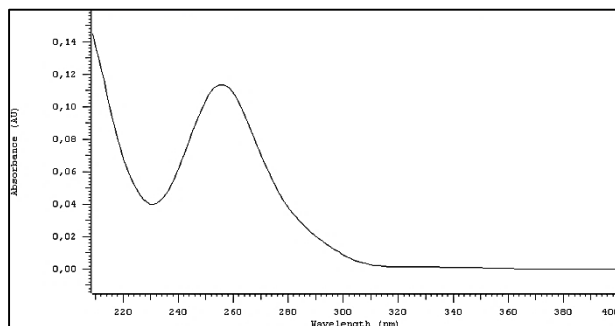
**Figura 2.5.** Cromatograma de los AINEs estudiados.

Las longitudes de onda empleadas para la detección de los AINEs estudiados se seleccionaron en función de los espectros de absorción correspondientes. Para ello, se empleó un espectrofotómetro de absorción Thermo Spectronic UNICAM UV 500 (Cambridge, Reino Unido). Los espectros de absorción obtenidos para cada uno de los compuestos se representan en la Figura 2.6.

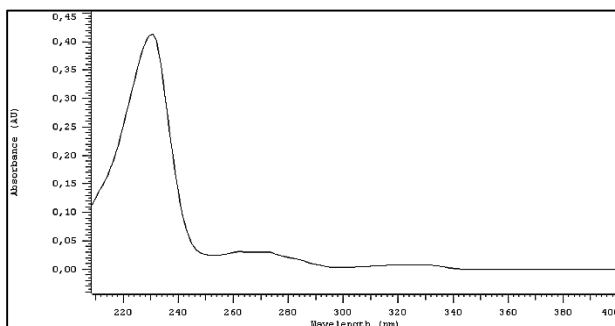


(a) SAL

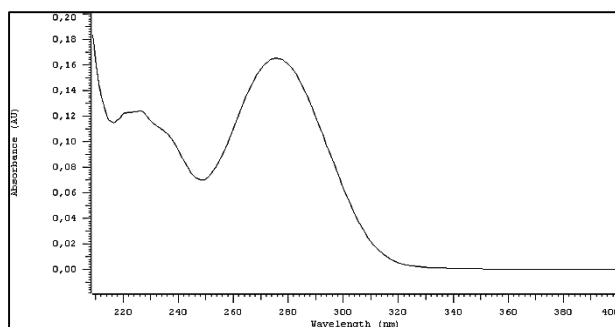




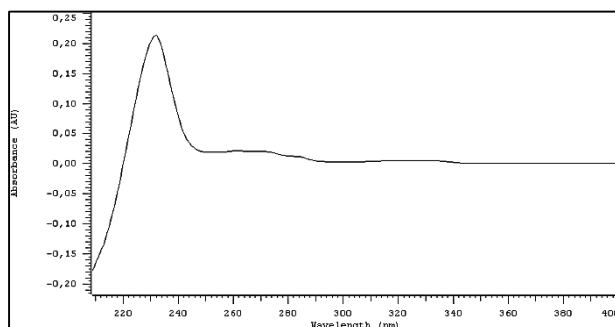
(b) KTP



(c) NAX



(d) DIC



(e) IBU

**Figura 2.6.** Espectros de absorción de los AINEs estudiados. (a) ácido salicílico (SAL), (b) ketoprofeno (KTP), (c) naproxeno (NAX), (d) diclofenaco (DIC), (e) ibuprofeno (IBU).

A partir de los espectros obtenidos, se seleccionaron las longitudes de máxima absorbancia de cada fármaco en la detección de los mismos, siendo 235 nm para SAL, 255 nm para KTP, 230 nm para NAX, 280 nm para DIC y 224 nm para IBU.

## **2.8. RESULTADOS**

### **2.8.1. Ensayos preliminares**

Se realizaron una serie de ensayos previos en los que se analizó la influencia que tienen en el proceso de extracción factores como el tipo de disolvente orgánico empleado, la presencia o ausencia de nanopartículas de plata en los films de agar o la existencia de campo eléctrico.

Estos ensayos preliminares se llevaron a cabo empleando como fase donadora disoluciones acuosas de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  en cada AINE seleccionado, films de  $25 \mu\text{m}$  de espesor y un contenido en plata de  $107,9 \text{ mg Ag/g}$  de agar como soporte de la membrana líquida y aplicando unas condiciones de extracción de  $50 \text{ V}$  durante 40 minutos. Asimismo, se emplearon dihexiléter y 1-octanol como disolventes orgánicos soportados.

Como se ha demostrado previamente para los procedimientos de microextracción en fase líquida (LPME) y extracción por electromembrana (EME) [25, 26], la eficiencia de la extracción aumenta con la velocidad de agitación siempre que no implique la formación de vórtices en la disolución donadora. Por este motivo, se fijó una velocidad de agitación de 600 rpm en todos los ensayos.

En un trabajo previo realizado en el seno del Grupo de Investigación donde se desarrolla esta Tesis, el disolvente orgánico seleccionado para un procedimiento anterior usando como soporte fibras huecas de polipropileno (HF-LPME) fue el dihexiléter [26]. Sin embargo, su empleo en EME no resultaba factible al interrumpirse la corriente eléctrica, imposibilitando, por tanto, la realización del proceso de extracción, motivo por el cual fue

reemplazado por 1-octanol [25]. En este caso, en cambio, los films nanometálicos permiten el uso de ambos disolventes, observándose mejores resultados con dihexiléter.

Asimismo, se aplicaron las condiciones antes descritas en el proceso de extracción empleando films de agar sin AgNPs. Para la realización de este ensayo, se prepararon films de agar de diferentes espesores siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.5, a excepción de la etapa correspondiente a la adición de AgNO<sub>3</sub>. En estas condiciones, como puede verse en la Tabla 2.3, los compuestos se extraían pero con factores de enriquecimiento muy bajos, con valores máximos comprendidos entre 0,5 y 0,9, para el film de menor espesor (20 µm), lo que evidencia la mejora que se produce por la presencia de AgNPs.

Adicionalmente, se ensayó el film nanometálico en ausencia de campo eléctrico (en condiciones de LPME), observándose en este caso que tras 40 minutos de extracción con agitación a 600 rpm, no se producía la extracción de ningún analito.

Los resultados derivados de estos ensayos previos indicaban, en primer lugar, que la ausencia de AgNPs en el film de agar conduce a rendimientos de extracción mucho menores que los obtenidos al emplear films conteniendo AgNPs. Asimismo, los ensayos revelaban que el empleo de films de agar con AgNPs en procesos de microextracción en fase líquida en ausencia de campo eléctrico no conduce a la extracción de los compuestos estudiados.

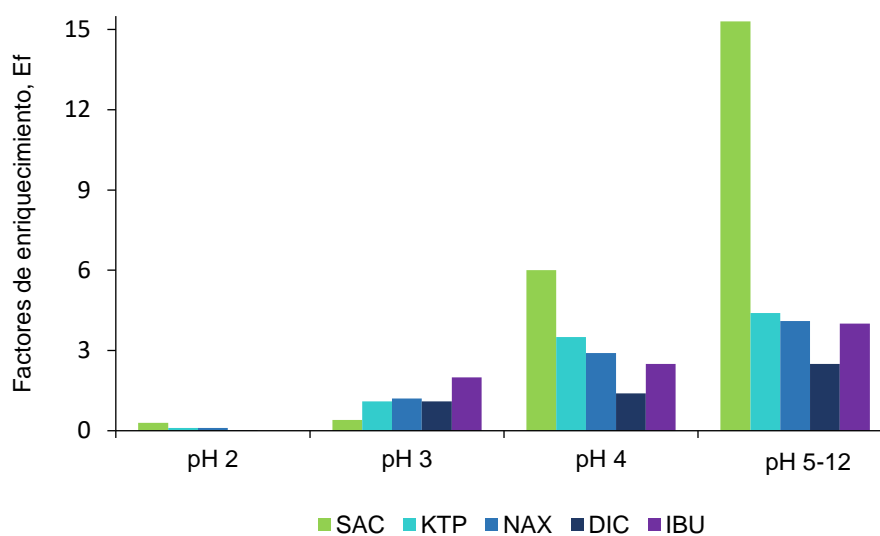
Una vez realizados los ensayos preliminares y, teniendo en cuenta las observaciones extraídas durante los mismos, se procedió a optimizar el procedimiento de extracción por electromembrana evaluando la influencia del pH, el espesor de la membrana, el tamaño de las nanopartículas y el tiempo y voltaje aplicados en el proceso de extracción.

## 2.8.2. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora

Como ya se ha indicado anteriormente, la elección adecuada del pH es un aspecto importante a tener en cuenta ya que de él va a depender, en gran parte, el flujo de analitos a través de la membrana líquida.

Así, con objeto de evaluar la influencia del pH en el procedimiento de extracción, se llevaron a cabo diferentes ensayos en los que se ajustó el pH de las fases donadora y aceptora en el rango 1-12.

En la Figura 2.7 se muestran los resultados obtenidos al variar el pH de la fase donadora, manteniendo la composición de la fase aceptora constante (agua ultrapura).



**Figura 2.7.** Influencia del pH de la fase donadora en la eficacia del proceso EME.

Puede observarse, en primer lugar, que no aparecen resultados para un valor de pH 1, lo cual se debe a que, a dicho pH, los films de agar se rompían, imposibilitando llevar a cabo el procedimiento de extracción.

En el rango de pH de 2 a 3, los factores de enriquecimiento que se obtienen son muy bajos (inferiores a 2), siendo ligeramente superiores para pH 3.

Como se puede observar, la eficacia de la extracción aumenta considerablemente a pH 4 y 5, alcanzándose los mayores factores de enriquecimiento para el ácido salicílico (6 a pH 4 y 15,3 a pH 5), mientras que los valores más bajos se registraron para el diclofenaco (1,4 a pH 4 y 2,5 a pH 5).

Se observó que, para valores de pH entre 5 y 12, los factores de enriquecimiento se mantenían prácticamente constantes para todos los AINEs, lo que concuerda con el hecho de que todos se encuentran en su forma neutra, es decir, completamente protonados, pues presentan valores de pKa comprendidos entre 3 y 4,8.

Por otra parte, se analizó la influencia del pH de la fase aceptora, observándose en este caso que los resultados obtenidos no se veían afectados al variar el pH de la misma.

Adicionalmente, se observó que la fase donadora conteniendo los AINEs en disolución acuosa presentaba un valor de pH alrededor de 5. Por tanto, los experimentos de extracción empleando films nanometálicos se desarrollaron sin llevar a cabo un control del pH en ninguna de las dos fases. En estas condiciones, el pH de la fase aceptora, correspondiente al del agua ultrapura, es 5,6 aproximadamente, mientras que el pH de la fase donadora es ligeramente más ácido debido a la naturaleza de los analitos presentes en ella.

### **2.8.3. Influencia del espesor del film y del tamaño de las AgNPs**

La caracterización de los diferentes tipos de films mediante microscopía electrónica (apartado 2.3) indica que el contenido en plata de los films determina el tamaño y la forma de las AgNPs generadas. El hecho de disponer de AgNPs con distintas formas y tamaños, podría ser, en principio, un parámetro a considerar en el procedimiento de extracción. Así, con objeto de determinar la influencia de las características de las AgNPs presentes en los films, así como del espesor de los mismos, se llevó a cabo el procedimiento de extracción empleando films con distintas cargas de plata

(55,0; 107,9 y 215,9 mg Ag/g agar), cada uno de ellos, a su vez, de 4 espesores diferentes (20, 25, 30 y 35  $\mu\text{m}$ ), como se describió en el apartado 2.2. El procedimiento de extracción se aplicó en todos los casos a la determinación de los AINEs indicados anteriormente (SAL, KTP, NAX, DIC e IBU), obteniéndose los factores de enriquecimiento que se representan en la Tabla 2.3.

Puede observarse que cuando se emplean films con un contenido en plata de 55,0 mg Ag/g agar y espesores de 20 y 25  $\mu\text{m}$ , los factores de enriquecimiento que se obtienen son prácticamente nulos para todos los compuestos. Para este mismo contenido en plata y espesores de 30 y 35  $\mu\text{m}$ , no se llegan a detectar los analitos.

Por otra parte, los films con un contenido en plata de 215,9 mg Ag/g agar y espesores de 30 y 35  $\mu\text{m}$ , se despegaron del capilar de vidrio durante el tiempo de extracción, lo que impedía llevar a cabo el procedimiento. No ocurría así cuando se empleaban films de menor espesor (20 y 25  $\mu\text{m}$ ) con el mismo contenido en plata, sin embargo, los factores de enriquecimiento que se obtenían en estos casos eran muy bajos, inferiores a 0,6 para la mayoría de los analitos. Únicamente se alcanzaban valores de 1,2 y 1,5 para el diclofenaco y el ibuprofeno, respectivamente, cuando se empleó el film de menor espesor (20  $\mu\text{m}$ ).

En cambio, se observó que para un contenido en plata de 107,9 mg Ag/g agar, la extracción resultaba eficiente para todos los compuestos, observándose los mayores enriquecimientos cuando se empleaba el film de menor espesor (20  $\mu\text{m}$ ). En este caso, los factores de enriquecimiento obtenidos para todos los compuestos presentan valores superiores a 2,5, alcanzándose un valor máximo de 15,3 para el ácido salicílico. Los factores de enriquecimiento más bajos para este contenido en plata se obtuvieron con films de 35  $\mu\text{m}$ , con valores entre 0,0 y 3,2, mejorándose ligeramente para un espesor de 30  $\mu\text{m}$  con valores entre 0,2 y 5,3.

**Tabla 2.3.** Factores de enriquecimiento obtenidos para films con distinto espesor y contenido en Ag.

<b>Factores de enriquecimiento<sup>a</sup></b>																
Films de diferente espesor conteniendo AgNPs																
<i>Analito</i>	Films sin AgNPs				215,9 mg Ag/g agar				107,9 mg Ag/g agar				55,0 mg Ag/g agar			
	20	25	30	35	20	25	30	35	20	25	30	35	20	25	30	35
	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$
<i>SAC</i>	0,9	0,7	0,3	*	0,1	0,0	*	*	15,3	5,3	5,3	3,2	0,3	0,2	n.d.	n.d.
<i>KTP</i>	0,5	0,3	0,1	*	0,3	0,3	*	*	3,4	2,4	2,5	1,2	0,0	0,1	n.d.	n.d.
<i>NAX</i>	0,7	0,3	0,1	*	0,5	0,1	*	*	2,5	0,6	0,5	0,3	0,1	0,0	n.d.	n.d.
<i>DIC</i>	0,8	0,6	0,2	*	1,2	0,1	*	*	2,7	1,5	0,2	0,0	0,0	0,0	n.d.	n.d.
<i>IBU</i>	0,9	0,7	0,3	*	1,5	0,2	*	*	2,6	2,8	0,7	1,0	0,0	0,1	n.d.	n.d.

\*despegados durante la extracción.

n.d.: no detectado.

<sup>a</sup>Todos los datos se calculan como la media de determinaciones por triplicado (% RSD<6).

Como puede observarse, se produce un incremento en los factores de enriquecimiento de los compuestos al disminuir el espesor del film. Asimismo, resulta evidente que las características de las nanopartículas de plata (tamaño y forma), directamente relacionadas con la cantidad de plata presente en el film, ejercen una gran influencia en el procedimiento de extracción. De hecho, como puede comprobarse en la Tabla 2.3, los mejores resultados se obtienen cuando se emplean films con un contenido intermedio de 107,9 mg Ag/g agar, correspondientes a AgNPs aisladas y esféricas de 20-30 nm de diámetro.

#### **2.8.4. Influencia del voltaje de extracción**

Una vez que se ha comprobado la influencia del espesor de los films, así como de las características de las AgNPs presentes en los mismos, se procedió a la optimización del voltaje y tiempo de extracción, para lo cual se aplicaron diferentes voltajes durante tiempos variables y con agitación de la muestra a 600 rpm.

Se observó que cuando se aplican voltajes inferiores a 40 V (10, 20 y 30 V) durante tiempos de extracción de 10, 20 y 40 minutos, no se consigue la extracción de los compuestos en ninguno de los casos. Por otra parte, cuando el voltaje alcanza un valor de 40 V, únicamente algunos de los AINEs son extraídos de la fase donadora, pero obteniéndose factores de enriquecimiento muy pobres.

Se aplicaron, por tanto, voltajes superiores (50, 60, 80 y 100 V) durante 20, 40 y 60 minutos, empleándose en todos los casos films con un contenido en plata de 107,9 mg Ag/g agar y un espesor de 20  $\mu\text{m}$  y sin control de pH en las fases donadora y aceptora. La Tabla 2.4 muestra los resultados obtenidos.



**Tabla 2.4.** Factores de enriquecimiento obtenidos con el film nanometálico óptimo para diferentes tiempos de extracción y voltajes aplicados.

Voltaje (V)	Tiempo de extracción (min)	Factores de enriquecimiento <sup>a</sup>				
		SAC	KTP	NAX	DIC	IBU
50	20	8,2	3,4	2,5	2,7	2,6
	40	15,3	4,4	4,1	2,5	4,0
	60	42	7,4	3,2	0,3	0,4
60	20	7,4	3,5	2,4	2,4	2,1
	40	14,8	4,6	4,0	2,3	3,5
	60	23,4	7,0	2,9	1,0	1,2
80	20	4,5	0,0	0,0	1,8	1,5
	40	15,1	3,0	1,4	2,1	2,2
	60	26,2	3,3	1,6	1,1	1,3
100	20	0,3	0,0	0,0	0,3	0,3
	40	14,5	2,0	1,3	1,5	1,3
	60	32,5	3,2	1,5	1,1	2,2

<sup>a</sup>Todos los datos se calculan como la media de determinaciones por triplicado % RSD<6.

Se puede observar que el ácido salicílico es el analito más sensible, dado que los factores de enriquecimiento obtenidos para dicho compuesto son los más elevados en todos los experimentos realizados. Por otra parte, atendiendo a los factores de enriquecimiento de todos los analitos, se observa que, en términos generales, los mejores resultados se obtienen cuando se aplican voltajes de 50 y 60 V.

### 2.8.5. Influencia del tiempo de extracción

En general, los factores de enriquecimiento aumentaban cuando se incrementa el tiempo de extracción de 20 a 40 minutos, con independencia del voltaje aplicado. Sin embargo, el comportamiento de los AINEs difiere para extracciones de 60 minutos. Así, los factores de enriquecimiento para el ácido salicílico y el ketoprofeno aumentan significativamente en todos los casos, siendo este aumento mucho más acentuado para el ácido salicílico.

En cambio, para el naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno, un tiempo de extracción de 60 minutos conducía, en general, a factores de enriquecimiento más bajos.

En general, la extracción aumenta con el tiempo hasta alcanzar un valor aproximadamente constante e incluso llega a disminuir. Esto puede ser debido a una resistencia a la transferencia de masa por la formación de una capa de iones en las correspondientes interfases localizadas a ambos lados de la membrana líquida soportada (SLM) o como resultado de la retrodifusión de los analitos hacia la misma [27].

#### **2.8.6. Procedimiento propuesto**

De acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones experimentales óptimas para llevar a cabo el procedimiento de extracción implican el uso de films de agar de 20  $\mu\text{m}$  de espesor y un contenido en plata de 107,9 mg Ag/g agar, correspondiente con nanopartículas de plata esféricas de 20-30 nm de diámetro.

Asimismo, el disolvente orgánico más apropiado para su uso como membrana líquida es dihexiléter, mientras que las condiciones de extracción se corresponden con la aplicación de un voltaje constante de 50 V de corriente continua durante 40 minutos y con agitación a 600 rpm.

Una característica importante de estos films nanometálicos como soporte de membranas líquidas para procedimientos de EME es la posibilidad de ser reutilizados durante varias extracciones consecutivas, pudiendo ser empleados hasta tres veces sin pérdida en la eficiencia de la extracción. De esta manera, el proceso se simplifica y el tiempo y coste de los análisis se reducen.

#### **2.8.7. Comparación de los films nanometálicos con otros soportes**

A fin de evaluar la eficacia del film nanometálico estudiado como soporte en procedimientos de extracción por electromembrana, se llevaron

a cabo una serie de ensayos adicionales, consistentes en el uso de idénticos dispositivos de extracción con otros soportes.

Teniendo en cuenta que el polipropileno es el material más comúnmente usado como soporte en procedimientos EME, estos ensayos adicionales se realizaron empleando membranas de este material.

En primer lugar, se empleó una fibra hueca de polipropileno Accurel® S6/2 de 1800  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, 450  $\mu\text{m}$  de espesor y 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Membrana, Wuppertal, Alemania) abierta en forma de lámina con objeto de obtener una superficie plana. Para ello, la fibra hueca se abrió cuidadosamente con la ayuda de un cúter y se presionó suavemente hasta obtener una lámina completamente plana de 7 mm x 7 mm. Seguidamente, la fibra abierta se sumergió durante unos minutos en acetona para su lavado y, una vez seca, se pegó con un pegamento especial para este tipo de materiales (Ceys®, Barcelona, España) sobre el extremo de un capilar de vidrio.

Por otro lado, se empleó una membrana plana porosa de polipropileno de 100  $\mu\text{m}$  de espesor (Accurel® PP 1E R/P, Membrana, Wuppertal, Alemania), que se cortó en fragmentos de 7 mm x 7 mm y se pegó empleando el mismo pegamento indicado antes sobre uno de los extremos de capilares de vidrio al igual que se hizo con la fibra abierta.

Una vez preparados ambos tipos de soportes, se llevó a cabo el procedimiento de extracción, empleando el mismo dispositivo EME que para los films de agar (Figura 2.4). En ambos casos, la extracción se llevó a cabo empleando las mismas condiciones experimentales óptimas de un trabajo previo desarrollado en nuestro grupo de investigación en el que se hacían uso de fibras huecas de polipropileno para la extracción por electromembrana de AINEs [25].

Los resultados obtenidos con estos dos soportes, junto con los proporcionados por el film de agar se representan en la Tabla 2.5.

**Tabla 2.5.** Comparación de los factores de enriquecimiento obtenidos con el empleo de diferentes soportes.

<b>Factores de enriquecimiento<sup>a</sup></b>			
<i>AINEs</i>	Film de agar con AgNPs	Membranas de polipropileno	
		6S/2	PP 1E
<i>SAC</i>	15,3	0,1	0,2
<i>KTP</i>	4,4	0,1	0,6
<i>NAX</i>	4,1	0,1	0,7
<i>DIC</i>	2,5	0,2	0,6
<i>IBU</i>	4,0	0,2	0,7

<sup>a</sup>Media de determinaciones por triplicado % RSD<6.

Como puede observarse, de todos los soportes empleados, la fibra hueca de polipropileno S6/2 (en forma de lámina) es la que proporcionaba los factores de enriquecimiento más bajos para todos los compuestos, con valores iguales o menores a 0,2. Por otra parte, la membrana de polipropileno plana de 100  $\mu\text{m}$  proporciona factores de enriquecimiento ligeramente mejores (entre 0,2 y 0,7). Los resultados obtenidos con el uso de los films de agar con AgNPs son muy superiores a los anteriores, con factores de enriquecimiento del orden de 10 a 30 veces más altos, alcanzando incluso un valor 70 veces superior para el ácido salicílico.

Se observa que el procedimiento de extracción mejora cuanto más delgado es el soporte que tienen que atravesar los compuestos. Así, la membrana plana de polipropileno de 100  $\mu\text{m}$  proporciona mejores resultados que la fibra abierta, de 450  $\mu\text{m}$  de espesor, y, a su vez, estos valores se incrementan con el uso de los films nanometálicos de 20  $\mu\text{m}$  de espesor. Así pues, es evidente que un pequeño espesor del soporte mejora el rendimiento de los procedimientos EME, de acuerdo con lo afirmado por Pedersen-Bjergaard y Eibar [28, 29].

Por otra parte, el elevado rendimiento obtenido en el procedimiento de extracción con el film nanometálico frente al resto de soportes hace pensar que su eficacia no se deba únicamente a su bajo espesor. De hecho, como se indicó en el apartado 2.8.3, los films de agar sin AgNPs conducen a rendimientos muy bajos. Por tanto, en este caso, la naturaleza química del soporte caracterizada por la presencia de nanopartículas de plata esféricas y aisladas es un factor determinante en la mejora del proceso EME. La presencia de AgNPs en los films de agar homogeniza el campo eléctrico a través de la SLM y conduce a disminuir la intensidad de corriente generada durante el proceso de extracción. Esto implica una mejora en el proceso de migración de los analitos y, por tanto, en el rendimiento de la extracción.

Los films nanometálicos, por tanto, constituyen una alternativa eficaz a los soportes tradicionalmente usados en procedimientos EME. Al elevado rendimiento que les confiere su bajo espesor y la presencia de AgNPs, se suman otras características. Así, la gran conductividad eléctrica que presentan las AgNPs permite que el procedimiento de extracción se desarrolle empleando disolventes orgánicos que, en otras condiciones, cortaban la corriente. Este es el caso del dihexiléter, cuyo uso en procedimientos EME no resultaba factible al interrumpir el paso de corriente [25] y que, sin embargo, gracias a las propiedades de conductividad que las AgNPs otorgan a los films de agar, puede recuperarse como disolvente orgánico para la membrana líquida soportada.

Asimismo, como ya se ha indicado anteriormente, estos films presentan la ventaja adicional de que pueden ser manufacturados en función de los requisitos necesarios en cada caso, mientras que los soportes tradicionales, como las fibras huecas y las membranas planas, presentan características que se limitan a la capacidad y disponibilidad de los distribuidores comerciales. Así, los films de agar podrían sintetizarse con diferentes nanopartículas metálicas (oro, plata, níquel, cobre, etc.) en una gran variedad de formas (esféricas, triangulares, chapadas, barras, etc.) y tamaños en función de los requerimientos. Además, se trata de soportes que

pueden ser funcionalizados, de manera que las nanopartículas metálicas sean específicas o selectivas para determinados analitos.

De esta forma, queda demostrada la eficacia de los films nanometálicos como soporte en procedimientos de extracción por electromembrana que, junto con las numerosas ventajas que presenta, hace que puedan considerarse como una alternativa viable y tentadora a los soportes tradicionales empleados para sistemas EME.

## REFERENCIAS

- [1] E. Raphael, C.O. Avellaneda, B. Manzolli, A. Pawlicka, Agar-based films for application as polymer electrolytes, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 1455-1459.
- [2] R. Armisen, Agar and agarose biotechnical applications, *Hydrobiologia* 221 (1991) 157-166.
- [3] R. Armisen, F. Galatas, Production, Properties and Uses of Agar.
- [4] M.K. Shukla, R.P. Singh, C.R.K. Reddy, B. Jha, Synthesis and characterization of agar-based silver nanoparticles and nanocomposite film with antibacterial applications, *Bioresour. Technol.* 107 (2012) 295-300.
- [5] J.W. Rhim, L.F. Wang, S.I. Hong, Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity, *Food Hydrocoll.* 33 (2013) 327-335.
- [6] J. Gudadhe, A. Yadav, A. Gade, P.D. Marcato, N. Durán, M. Rai, Preparation of an agar-silver nanoparticles (A-AgNp) film for increasing the shelf life of fruits, *IET–Nanobiotechnol.* 8 (2014) 190-195.
- [7] M. Monge, Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas, *An. Quím.* 105 (2009) 33–41.

- [8] S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, Review: Micro- and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications, *Anal. Chim. Acta* 641 (2009) 7-13.
- [9] F. Rezaei, Y. Yamini, M. Moradi, B. Ebrahimpour, Solid phase extraction as a cleanup step before microextraction of diclofenac and mefenamic acid using nanostructured solvent, *Talanta* 105 (2013) 173-178.
- [10] A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review, *Anal. Chim. Acta* 677 (2010) 108-130.
- [11] A.V. Herrera-Herrera, M.A. González-Curbelo, J. Hernández-Borges, M.Á. Rodríguez-Delgado, Carbon nanotubes applications in separation science: A review, *Anal. Chim. Acta* 734 (2012) 1-30.
- [12] R. Sitko, B. Zawisza, E. Malicka, Modification of carbon nanotubes for preconcentration, separation and determination of trace-metal ions, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 22-31.
- [13] M. Bhadra, S. Mitra, Nanostructured membranes in analytical chemistry, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 248-263.
- [14] M. T. Frejo, M. J. Díaz, M. Lobo, J. García, M. Capó, Nanotoxicología ambiental: retos actuales, *Medicina Balear* 26 (2011) 36-46.
- [15] E. Ghasemi, N.M. Najafi, F. Raofie, A. Ghassempour, Simultaneous speciation and preconcentration of ultra traces of inorganic tellurium and selenium in environmental samples by hollow fiber liquid phase microextraction prior to electrothermal atomic absorption spectroscopy determination, *J. Hazard. Mater.* 181 (2010) 491-496.
- [16] X. Pu, B. Chen, B. Hu, Solvent bar microextraction combined with electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of inorganic arsenic in water samples, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 679-684.

- [17] A. Ávalos, Al. Haza, D. Mateo, P. Morales, Silver nanoparticles: applications and toxic risks to human health and environment, *RCCV-Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 7 (2013) 1-23.
- [18] H. Jiang, B. Hu, B. Chen, L. Xia, Hollow fiber liquid phase microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of arsenic (III) and arsenic (V) in fresh waters and human hair extracts, *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 15-21.
- [19] E. Muthuswamy, S. Sree Ramadevi, H.N. Vasan, C. Garcia, L. Noe, M. Vereldt, Highly stable Ag nanoparticles in agar-agar matrix as inorganic-organic hybrid *J. Nanopart. Res.* 9 (2007) 561-567.
- [20] M. Fera, Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos, Jesús Florez, Juan Antonio Armijo, África Mediavilla (Eds.) *Farmacología Humana* (1997) 355-387.
- [21] A.S. Michaelidou, D. Hadjipavlou-Litina, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): a Comparative QSAR Study, *Chem. Rev.* 105 (2005) 3235-3271.
- [22] P. Maslo, R. O. Cervera, N. Casals, N, *Las dolencias de la espalda*, Ed. Paidotribo (2001).
- [23] J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. Goodman-Gilman, Analgésicos antipiréticos, antiinflamatorios y fármacos que se utilizan en el tratamiento de la gota. Goodman & Gilman, *las bases farmacológicas de la terapéutica*, 27 (1996).
- [24] C. Jiménez-Cartagena, Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos, *Rev. Lasallista Investig.* 8 (2011) 143-153.
- [25] M. Ramos-Payán, M.A. Bello-López, R. Fernández-Torres, M. Villar-Navarro, M. Callejón-Mochón, Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples, *Talanta* 85 (2011) 394-399.



- [26] M. Ramos-Payán, M. A. Bello-López, R. Fernández-Torres, J. L. Pérez-Bernal, M. Callejón-Mochón, HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME), *Anal. Chim. Acta* 653 (2009) 184-190.
- [27] S. Nojavan, A. R. Fakhari, Electro membrane extraction combined with capillary electrophoresis for the determination of amlodipine enantiomers in biological samples, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3231-3238.
- [28] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Drop-to-drop microextraction across a supported liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1496-1502.
- [29] L.E.E. Eibak, M.P. Parmer, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel electromembrane extraction in a multiwell plate, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 431-440.



## CAPÍTULO 3.

Tejidos nanoestructurados Tiss®-OH

---



## SUMMARY

In this section, a nanostructured support is proposed for carrier-mediated electromembrane extraction of highly polar compounds. This support (Tiss®-OH) is a 100 µm thickness sheet nanofiber membrane composed by acrylic nanofibers and manufactured by electrospinning by nanoMyP® (Granada, Spain).

This support has been used in the extraction, combined with the subsequent separation and detection by HPLC/UV-DAD, of four high polarity acidic compounds: nicotinic acid (NIC), amoxicillin (AMX), hippuric acid (HIP) and salicylic acid (SAL).

Tissues with different properties were supplied and tested in a collaborative way with nanoMyP® in order to provide valuable information for developing the final manufacturing procedure of these materials.

Composition of the SLM, volume and pH of donor and acceptor phases, voltage and extraction time were investigated. Once the optimal conditions were established, the analytes were extracted from an aqueous sample solution (pH 4) (donor phase) using a Tiss®-OH sheet that supports a 5% (w/v) Aliquat®336 in 1-octanol liquid membrane. Aqueous solution (pH 6) was used as acceptor phase. The electrical field was generated from a d.c. electrical current of 100 V through two spiral shaped platinum wires placed into donor and acceptor phases. In these conditions, the analytes were extracted in 10 min with recoveries in the 60–85% range.

Additionally, the proposed EME procedure was successfully applied to the determination of the target analytes in human urine samples.



### 3.1. DESCRIPCIÓN DEL SOPORTE

El uso de tejidos nanoestructurados, compuestos por nanofibras poliméricas, en procedimientos EME, constituye otra posible alternativa a los soportes tradicionales.

El empleo de este tipo de soporte en sistemas EME surgió en la búsqueda de materiales más apropiados para la extracción de compuestos de elevada polaridad, dada la problemática que supone su baja lipofilia a la hora de abandonar las disoluciones acuosas y atravesar la SLM característica de estos sistemas.

En este sentido, los tejidos nanoestructurados que se presentan en este capítulo son materiales más hidrofílicos que las fibras de polipropileno habitualmente empleadas, por lo que podrían facilitar, a priori, el transporte de estos compuestos a través de la SLM, participando, por tanto, de manera activa en el procedimiento de extracción.

Los tejidos nanoestructurados empleados en esta Tesis han sido proporcionados por la empresa granadina nanoMyP®, Spin Off de la Universidad de Granada especialista en el diseño y síntesis de nano y micropartículas poliméricas e híbridas, polímeros y copolímeros lineales y materiales inteligentes con propiedades físico-químicas adaptadas a las necesidades del cliente, proporcionando, por tanto, materiales "a la carta". De manera colaborativa con dicha empresa, se han ensayado diferentes tejidos suministrados a demanda, de cuyas pruebas experimentales se obtuvo información de gran utilidad que sirvió de base para el desarrollo y la implementación del proceso de fabricación de este tipo de materiales.

*Tiss®-OH* hace referencia a nuevos soportes nanoestructurados altamente difusivos y versátiles, de fácil funcionalización y manipulación (física y química). Se trata de un soporte mucho más versátil que el ampliamente usado polietileno, cuyas características permite su posible participación activa en el proceso de microextracción, incluso en reacciones antígeno-anticuerpo específicas o altamente selectivas.

Bajo la denominación de *Tiss®-Membranes*, estos materiales constituyen una familia de tejidos de fibras poliméricas producidos mediante electrospinning con diversas funcionalizaciones químicas y/o dopados con nanopartículas metálicas [1]. Se trata de productos muy versátiles cuyas características les confieren la posibilidad de ser empleados en múltiples aplicaciones. Así, encuentran cabida tanto en el sector biotecnológico como en otros campos, resultando ser muy buenos candidatos para la inmovilización química de cualquier tipo de molécula (biomoléculas, fármacos, tintes, nanopartículas) para la preparación de kits de ensayo y diagnóstico (ELISA), biocatálisis (biotransformaciones, química enzimática orgánica), sistemas de liberación controlada de moléculas (medicamentos, antioxidantes o antimicrobianos), descontaminación o eliminación de metales del agua, nuevas fases sensoras ópticas, envases y etiquetas inteligentes, etc.

Estos tejidos se caracterizan por presentar una superficie específica muy elevada, superando con creces a la de las fibras y láminas de polipropileno. Asimismo, son altamente hidrofílicos pero insolubles tanto en medio acuoso como en disolventes apolares, como aceite, tolueno, etc. No obstante, al ser fácilmente funcionalizables, es posible controlar su hidrofobicidad con objeto de sintetizar tejidos que sean altamente hidrofóbicos.

Por otra parte, presentan excelentes propiedades mecánicas que los hacen fáciles de manipular. En este sentido, poseen elevada resistencia mecánica y consistencia (por lo que no se deshilachan), flexibilidad, alta resistencia a la temperatura (pudiendo soportar temperaturas de hasta 100°C) y, además, mantienen la estructura de la fibra tanto en medios acuosos como en mezclas de agua y disolventes orgánicos. Presentan, asimismo, excelentes propiedades químicas, basadas en la tecnología patentada de *NanoMyP®*, para la inmovilización covalente directa de una alta carga de casi cualquier tipo de biomolécula (enzima, anticuerpo,

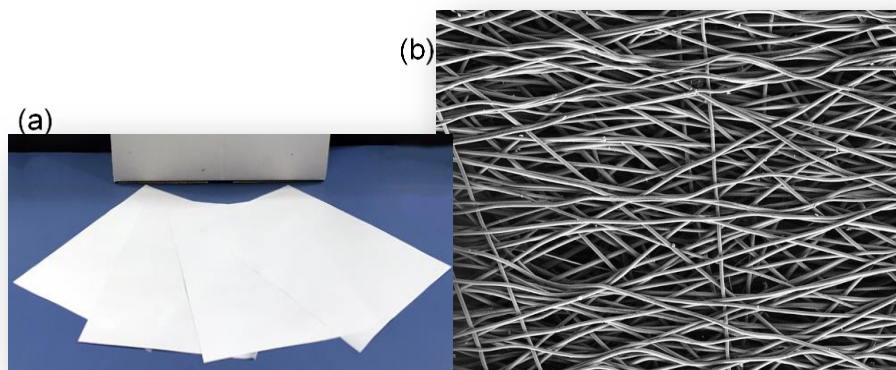


antígeno) en condiciones suaves de temperatura, pH y tiempo. Todo esto hace que sean fácilmente procesables a escala industrial y a bajo coste.

Dentro de la familia *Tiss®-Membranes*, existen distintas variedades de tejidos con diferentes características y aplicaciones. Así, se pueden encontrar, entre otros, tejidos preactivados para la inmovilización covalente directa de biomoléculas que contengan grupos tiol, amina y/o imidazol a la superficie del tejido, dando lugar a un material altamente bioactivo (*Tiss®-Link*) que no necesita ser preactivado para la inmovilización. Este hecho implica un aumento de la sensibilidad con una menor cantidad de biomolécula, así como la mejora de la estabilidad de las biomoléculas inmovilizadas. Asimismo, se pueden encontrar tejidos con una gran cantidad de nanopartículas metálicas de plata y oro para la inmovilización y purificación de biomoléculas (*Tiss®-Metal*).

En este caso, los tejidos propuestos como soporte para la membrana líquida en procedimientos EME, *Tiss®-OH*, están funcionalizados con grupos hidroxilo ( $-OH$ ), lo que los hace altamente hidrofílicos. Presentan un espesor de 100  $\mu m$  y un tamaño de poro entre fibras variable, entre 800 nm para nanofibras secas y 1-3  $\mu m$  para nanofibras húmedas. En la Figura 3.1, se muestra una imagen del tejido *Tiss®-OH*, obtenida por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), donde se pueden observar las fibras de tamaño nanométrico en la estructura de la membrana.

Teniendo en cuenta las numerosas ventajas y características que presentan estos materiales nanoestructurados, se propone, por primera vez, el estudio de su aplicabilidad en los procedimientos de extracción por electromembrana al ser empleados como soporte de las membranas líquidas.

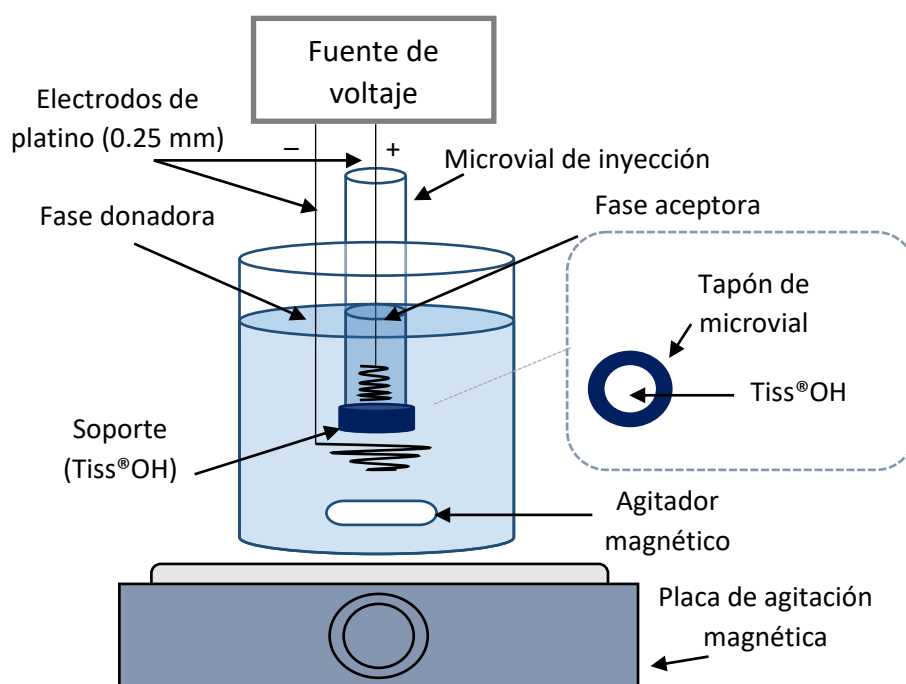


**Figura 3.1.** (a) Láminas de *Tiss@-OH*; (b) imagen TEM de la membrana de nanofibras.

### 3.2. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

El dispositivo experimental empleado para el procedimiento de extracción por electromembrana usando *Tiss@-OH* como soporte se representa en la Figura 3.2. En este caso, en lugar de los capilares de vidrio empleados con los films con AgNPs, se emplean microviales de inyección (2 mL 2-SV, Chromacol, Welwyn Garden City, UK) como compartimento o contenedor de la fase aceptora. Para ello, la base del microvial se corta previamente, de manera que ese extremo permanezca abierto para poder introducir tanto la fase aceptora como el electrodo. El tejido nanoestructurado *Tiss@-OH* se corta en pequeñas láminas de 1 cm x 1 cm aproximadamente y se coloca en el interior del tapón del microvial, enroscándolo para sellar el compartimento por presión, de manera que quede hermético. A continuación, el microvial, sellado con el tapón y el tejido en su interior, se impregna en el disolvente orgánico durante 5 segundos, eliminando posteriormente el exceso de disolvente con papel. Seguidamente, se introducen, por el extremo abierto del vial, la fase aceptora y un electrodo de platino (0.25 mm de diámetro), y todo esto se introduce, a su vez, en el interior de un vial de 10 mL que contiene la fase donadora y otro electrodo de platino. Ambos electrodos, se conectan a una

fuente externa de voltaje (VWR International, West Chester, Pensilvania, EEUU) encargada de suministrar el potencial adecuado para llevar a cabo el procedimiento de extracción. Una vez finalizada la extracción, se desconecta la fuente, se recoge la fase aceptora con ayuda de una microjeringa y se transfiere posteriormente a un microinserto para su inyección en el sistema cromatográfico.



**Figura 3.2.** Dispositivo experimental empleado en el procedimiento EME con Tiss®-OH.

Empleando este procedimiento, se estudiaron los diferentes parámetros que influyen en el proceso de extracción, como son el disolvente orgánico empleado como membrana líquida, el voltaje aplicado, el pH y volumen de las fases aceptora y donadora, el tiempo de extracción y la cantidad de carrier disuelto en la membrana líquida.

### 3.3. COMPUESTOS ESTUDIADOS

Los tejidos nanoestructurados Tiss®-OH, como se ha indicado previamente, se emplearon a fin de favorecer la extracción de compuestos muy polares, cuyo procedimiento resulta muy difícil dada la naturaleza de los mismos.

En este sentido, además de los ya mencionados con anterioridad, uno de los parámetros que también influye en la extracción de los analitos es el coeficiente de partición de los mismos, expresado habitualmente como  $\log P$ . Se define como el cociente entre las concentraciones de analito en las dos fases constituidas por dos disolventes inmiscibles en equilibrio, de manera que es una medida de su solubilidad en ambos disolventes. A diferencia del resto de parámetros, como la composición de la SLM, el pH de las fases donadora y aceptora, el tiempo o el voltaje de extracción, el  $\log P$  de los compuestos es un parámetro fijo y no puede variarse para favorecer el rendimiento del proceso EME y la transferencia de masa de los analitos desde la fase donadora hasta la SLM depende en gran parte de su valor [2].

Así, la técnica de EME se ha aplicado con éxito a la extracción de compuestos hidrofóbicos, con un valor de  $\log P > 2$ , obteniéndose buenas recuperaciones de los mismos en matrices biológicas y medioambientales. Sin embargo, dada su considerablemente baja lipofilia, los compuestos altamente polares ( $\log P < 2$ ) presentan mayor afinidad por la muestra acuosa que por el disolvente orgánico, por lo que suelen permanecer en la muestra junto con la mayoría de las sustancias interferentes [3]. Por ello, la extracción de este tipo de compuestos continúa siendo un desafío para los procedimientos de preparación de muestra, incluso para la técnica de extracción por electromembrana, siendo necesario, por tanto, el empleo de condiciones estrictas, como un elevado voltaje o tiempos de extracción relativamente largos. Asimismo, resulta imprescindible la adición de carriers a la SLM para promover la transferencia del analito e incrementar así la eficacia del proceso de extracción de compuestos polares [4, 5]. En general, la EME de compuestos muy polares, tanto ácidos como básicos, implica

recuperaciones muy pobres, tanto menor cuanto mayor sea la polaridad de los compuestos estudiados, incluso con el uso de carriers [6].

Entre ellos, el DEHP (di(2-ethylhexyl) phosphate) y el TEHP (tri(2-ethylhexyl) phosphate) son los carriers más comúnmente empleados como aditivos en el disolvente orgánico. El primero forma pares iónicos con analitos básicos cargados positivamente, mientras que el segundo es un carrier no iónico que actúa a través de fuerzas intermoleculares (dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno) con analitos cargados [5]. Asimismo, el DEHPi (bis(2-ethylhexyl) phosphite) ha sido empleado como SLM para compuestos básicos con  $\log P < 2$  [3].

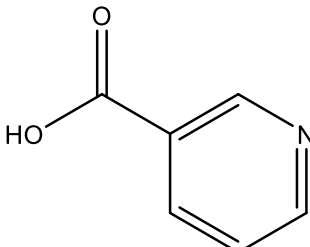
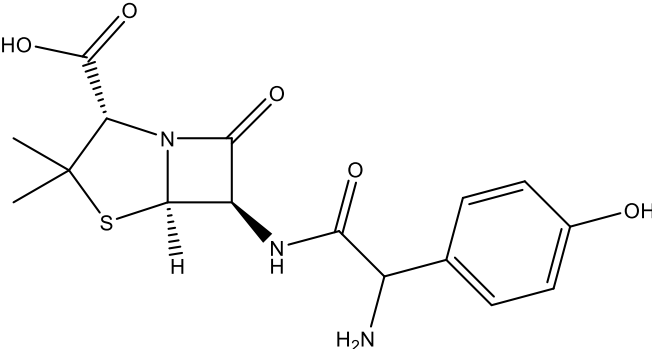
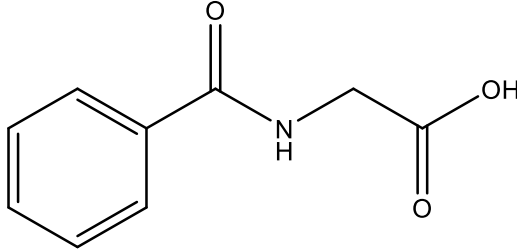
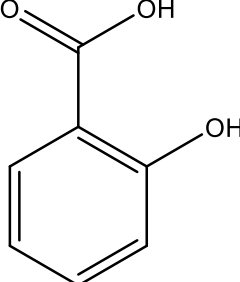
A pesar de la dificultad para la extracción de este tipo de compuestos, en este capítulo se propone el uso de los tejidos nanoestructurados Tiss®-OH como soportes alternativos para la extracción de cuatro compuestos ácidos de elevada polaridad, como son el ácido nicotínico (NIC), la amoxicilina (AMX), el ácido hipúrico (HIP) y el ácido salicílico (SAL), cuyas estructuras y principales propiedades se muestran en la Tabla 3.1.

El ácido nicotínico, también conocido como niacina, constituye, junto con su amida correspondiente (nicotinamida) la forma más común de la vitamina B3. Esta vitamina es uno de los principales nutrientes esenciales del ser humano, por lo que este compuesto tiene un importante papel en diversos procesos biológicos y bioquímicos que concurren en los mismos [7, 8]. Asimismo, el ácido nicotínico constituye además un agente farmacológico aplicado clínicamente en el tratamiento de algunas enfermedades relacionadas con los niveles de lípidos en sangre, debido a su capacidad para disminuir los niveles del llamado “colesterol malo” o LDL en favor de un incremento de los niveles de HDL o “colesterol bueno” [9].

El ácido hipúrico es una acil glicina formada por conjugación de la glicina con el ácido benzoico. Se trata de uno de los metabolitos endógenos mayoritarios generados en la orina humana, cuyos niveles se incrementan con el consumo de compuestos fenólicos presentes en el té, el vino o el zumo de frutas [10]. Dichos fenoles son transformados a ácido benzoico que,

posteriormente, se metaboliza hasta ácido hipúrico, excretándose en la orina. Por otra parte, se han encontrado elevadas concentraciones de este compuesto en orina como una posible causa de diabetes infantil y fallos renales [11, 12]. Asimismo, elevadas concentraciones de ácido hipúrico en la orina podrían indicar también una intoxicación por tolueno, al ser metabolizado hasta ácido hipúrico vía ácido benzoico [13, 14].

**Tabla 3.1.** Estructura y características de los compuestos ácidos polares estudiados.

<p><b>Ácido nicotínico</b>  <i>pyridine-3-carboxylic acid</i>  <math>C_6H_5NO_2</math>            PM= 123.111 g/mol            Número CAS: 59-67-6  <math>pK_a = 2.08</math>  <math>\log P = 0.4</math></p>	
<p><b>Amoxicilina</b>  <i>(2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hydroxyphenyl)acetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid</i>  <math>C_{16}H_{19}N_3O_5S</math>            PM= 365.404 g/mol            Número CAS: 26787-78-0  <math>pK_a = 2.4</math>  <math>\log P = -2</math></p>	
<p><b>Ácido hipúrico</b>  <i>2-benzamidoacetic acid</i>  <math>C_9H_9NO_3</math>            PM= 179.175 g/mol            Número CAS: 495-69-2  <math>pK_a = 2.08</math>  <math>\log P = 0.3</math></p>	
<p><b>Ácido salicílico</b>  <i>2-Hydroxybenzoic acid</i>  <math>C_7H_6O_3</math>            PM= 138.122 g/mol            Número CAS: 69-72-7  <math>pK_a = 2.80</math>  <math>\log P = 2.3</math></p>	

Fuente: PubChem.

Por su parte, la amoxicilina es un antibiótico semisintético, estable a ácidos, análogo de la ampicilina, con un amplio espectro de actividad bactericida contra numerosos microorganismos (bacterias grampositivas y gramnegativas) debido a la presencia de un anillo de bencilo en la cadena lateral. Actúa impidiendo el crecimiento bacteriano y se usa normalmente para el tratamiento de infecciones bacterianas comunes como neumonía, bronquitis, enfermedades venéreas, así como infecciones de la piel, el tracto urinario, la nariz, los pulmones y el oído. También puede emplearse antes de una cirugía o intervención dental para prevenir infecciones [15].

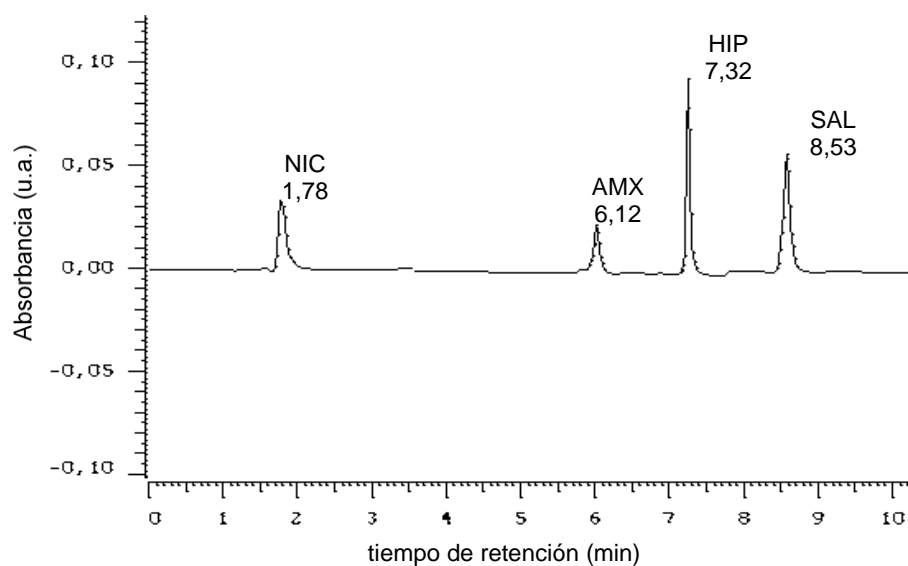
### **3.4. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA**

La determinación de los compuestos polares seleccionados se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta de diodos en fila (UV-DAD), empleando el mismo equipo descrito anteriormente para los films de agar en la Sección 2.7 (Agilent-Technologies Serie 1100 (Palo Alto, CA, EEUU)).

Para la separación cromatográfica de estos compuestos polares se empleó una columna LiChroCART® 75-4 Purospher® STAR RP-18e 3 µm (75 mm x 4 mm d.i.) (VWR, Darmstadt, Alemania) equipada con una precolumna Kromasil® 100 Å, C18, 5 µm (15 mmx4.6 mm d.i.) (Scharlab S.L., Barcelona, España) y termostaticada a 20°C. La fase móvil consistió en una mezcla de ácido fórmico al 0.05% (v/v) (componente A) y acetonitrilo (componente B) y se usó elución en gradiente con un flujo de fase móvil constante de 0.8 mL min<sup>-1</sup>. Las condiciones cromatográficas se indican en la Tabla 3.2 y en la Figura 3.3 se muestra el cromatograma obtenido en dichas condiciones de separación.

**Tabla 3.2.** Condiciones cromatográficas para la elución en gradiente de los compuestos polares seleccionados. A: ácido fórmico 0.05% (v/v), B: Acetonitrilo (ACN).

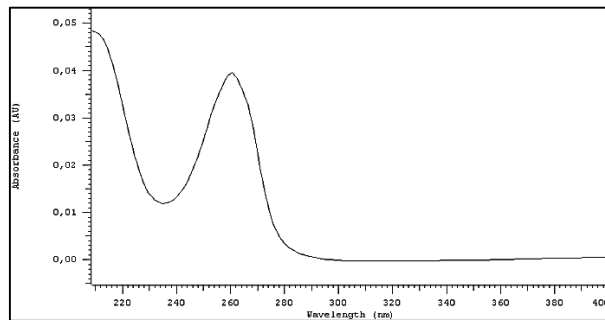
Tiempo (min)	% A	% B
0	99	1
3	90	10
4	90	10
4,1	60	40
12	60	40



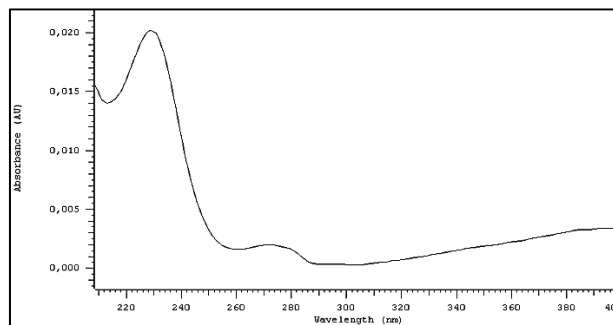
**Figura 3.3.** Cromatograma de los compuestos polares seleccionados.

La detección UV-DAD de los compuestos se realizó empleando las longitudes de onda obtenidas a partir de los espectros de absorción correspondientes, representados en la Figura 3.4.

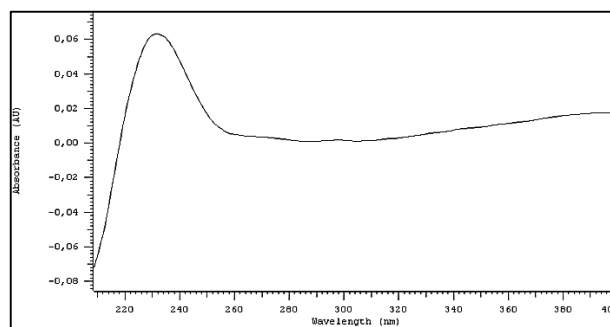




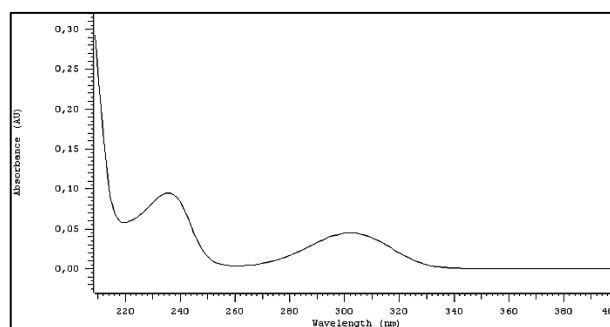
(a) NIC



(b) AMX



(c) HIP



(d) SAL

**Figura 3.4.** Espectros de absorción de los compuestos polares estudiados. (a) ácido nicotínico (NIC), (b) amoxicilina (AMX), (c) ácido hipúrico (HIP) y (d) ácido salicílico (SAL).

Teniendo en cuenta los espectros indicados en la Figura 3.4, las longitudes de onda seleccionadas para la detección de los diferentes compuestos fueron 260 nm para NIC, 230 nm para AMX y 235 nm para HIP y SAL.

### **3.5. RESULTADOS**

#### **3.5.1. Estudios previos del comportamiento de diferentes tipos de tejidos**

Durante el desarrollo experimental de este apartado se realizaron algunos ensayos con tejidos obtenidos durante distintas fases del procedimiento de fabricación de los mismos, con idea de analizar su manipulación y comportamiento como posible alternativa a los soportes tradicionales empleados en EME.

Se adquirieron en primer lugar dos tipos de tejidos, uno de ellos con propiedades hidrofílicas obtenido tras una etapa de tratamiento térmico (TNAH), y otro obtenido de la misma forma, a excepción de esa etapa térmica, lo que le proporcionaba cierta hidrofobicidad (TNBH).

Las pruebas realizadas con estos dos tipos de tejidos consistieron básicamente en analizar su comportamiento en presencia de diferentes disolventes orgánicos, así como su resistencia eléctrica en contacto con las diferentes fases acuosas (donadora y aceptora).

Como ya se ha indicado anteriormente, el disolvente orgánico empleado como SLM en procedimientos EME debe tener una cierta hidrofobicidad que lo haga inmisible con el agua y así poder formar la membrana líquida y, a su vez, debe ser suficientemente conductor para permitir la existencia de corriente eléctrica en el sistema.

En este sentido, se analizó el comportamiento de los tejidos al ser impregnados con diferentes disolventes orgánicos, así como las características que presentaba la superficie del tejido impregnado al

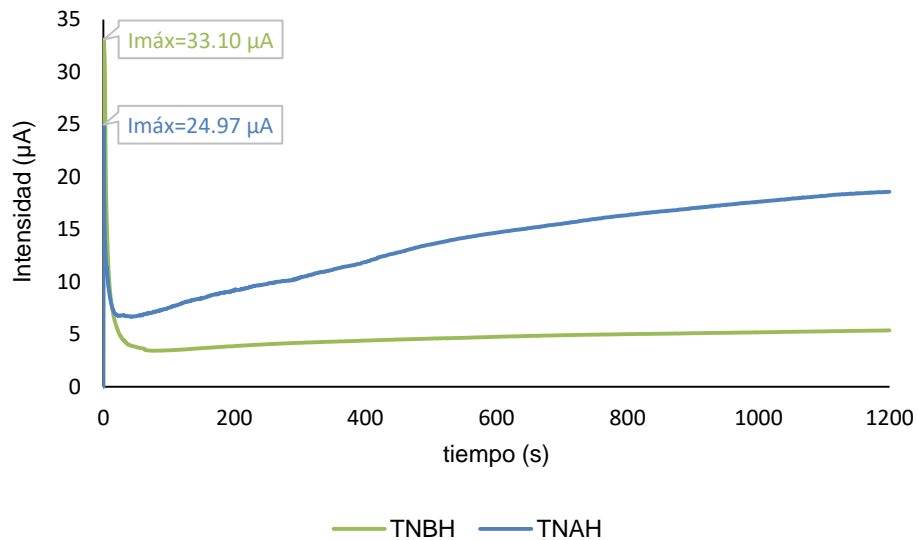
adicionar sobre ella una gota de agua. Para estas pruebas, se empleó el tejido más hidrofílico (con tratamiento térmico).

Se observó que, disolventes como metanol, hexanol, t-butanol, 3-piridilcarbinol, difenilpropanodiol y 4-fluorobencilalcohol deterioraban el tejido al impregnarlo. Por otra parte, hexano, tolueno y orto-, meta- y para-xileno, se evaporaban con cierta rapidez. En cambio, dihexiléter, 1-octanol, peppermint oil, nitrofeniloctiléter (NPOE) y tiofenol proporcionaban buenos resultados ya que aseguraban la inmiscibilidad de las disoluciones donadora y aceptora cuando ambas fases se pusieran en contacto a través de la SLM. De todos ellos, el tiofenol resulta ser moderadamente tóxico y dihexiléter, peppermint oil y NPOE cortaban la corriente eléctrica. Por tanto, debido a sus características de impregnación e hidrofobicidad, así como por su baja toxicidad y relativamente alta constante dieléctrica, el 1-octanol resultaba ser el disolvente orgánico más adecuado para su empleo como SLM en procedimientos EME con este tipo de soporte.

Por otra parte, se llevó a cabo un registro de la intensidad de corriente generada durante el procedimiento de extracción cuando se emplean este tipo de tejidos como soportes de la SLM. Para ello, se empleó un multímetro digital (3430 4 ½-digit PeakTech®, Ahrensburg, Alemania) capaz de registrar, para un potencial constante, dos valores de intensidad por segundo. En la Figura 3.5, se muestran las curvas de intensidad obtenidas con cada uno de los tejidos empleados.

Como puede observarse en estas representaciones, el procedimiento de extracción se caracteriza por un pico de intensidad en el momento inicial, seguido de un brusco descenso. La tendencia posterior difiere para cada tipo de tejido, siendo ésta creciente para el TNAH, con valores más altos de intensidades de corriente, mientras que para el TNBH los valores de intensidad alcanzados son inferiores y se mantienen prácticamente constantes durante todo el proceso de extracción. Estas observaciones se ajustan a la naturaleza de los tejidos, ya que el tejido de mayor carácter

hidrofílico (TNAH) y, por tanto, menor resistencia eléctrica, es el que genera valores más elevados de intensidad de corriente.



**Figura 3.5.** Curva intensidad vs tiempo de extracción con tejidos TNBH y TNAH (para detalles ver texto).

Una posible interpretación de este comportamiento podría ser la formación inicial de una doble capa eléctrica como consecuencia de la diferencia de potencial aplicada, lo que se correspondería con el pico de intensidad observado. Asimismo, el comportamiento posterior de las curvas de intensidad podría deberse al inicio y consecución del proceso de electromigración, de manera que la transferencia de iones desde la fase donadora a la aceptora se caracterizaría por un descenso de la intensidad de corriente generada. Por tanto, según esta interpretación, un comportamiento creciente de la intensidad implicaría una menor transferencia de iones y, en consecuencia, una menor eficacia de extracción.

### 3.5.2. Ensayos preliminares

Para llevar a cabo la optimización de los diferentes factores operacionales que influyen en el procedimiento de extracción, se usó un tejido completamente desarrollado y optimizado por la empresa nanoMyP®,

denominado Tiss-OH®, de gran hidrofiliidad debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura.

Dada las características observadas anteriormente con cada uno de los diferentes disolventes orgánicos probados, se seleccionó 1-octanol como disolvente para la SLM.

Por otro lado, debido a que el uso de carriers puede mejorar la extracción de compuestos muy polares [16] y teniendo en cuenta que en la fase donadora los analitos estudiados se encuentran mayoritariamente en su forma desprotonada, se usó como SLM 1-octanol conteniendo un 5% (p/v) de Aliquat®336 (carrier catiónico) en los diferentes ensayos de extracción por electromembrana.

Así, las primeras pruebas se llevaron a cabo usando el procedimiento descrito anteriormente, aplicando un voltaje de 100 V durante 10 minutos y con agitación a 300 rpm. Se seleccionó este voltaje ya que valores superiores conducían a un incremento del volumen de la fase aceptora durante el proceso de extracción, mientras que en el caso de aplicar voltajes más bajos, las extracciones eran muy pobres.

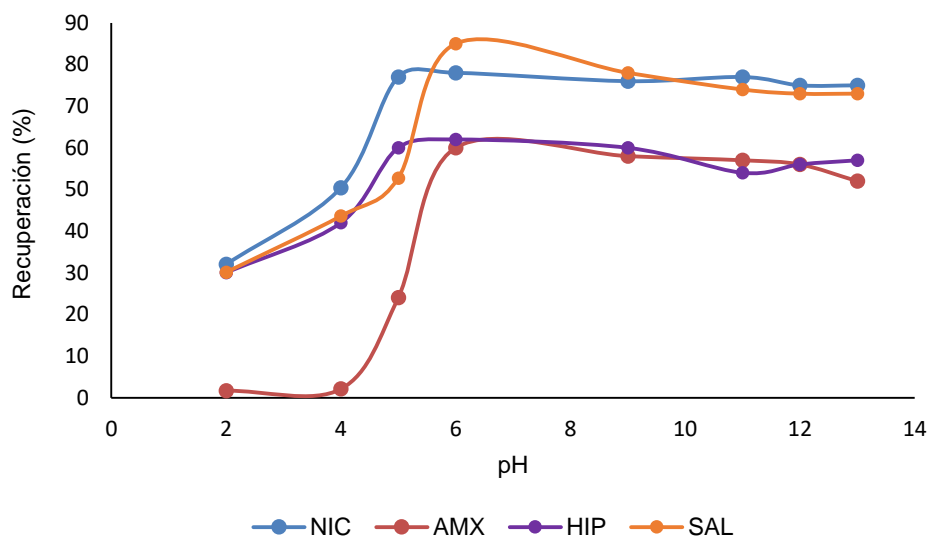
Con idea de optimizar la eficacia del proceso de extracción de los analitos estudiados, se evaluó la influencia de diferentes factores experimentales como el pH y el volumen de las fases aceptora y donadora, el voltaje aplicado, el tiempo de extracción y la cantidad de carrier disuelto en el disolvente orgánico empleado como SLM.

### **3.5.3. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora**

Para estudiar la influencia del pH en el proceso de extracción, se empleó como fase donadora 10 mL de una disolución acuosa de los compuestos seleccionados de 1 mg L<sup>-1</sup> de concentración y 300 µL de disolución acuosa como fase aceptora. El volumen de fase aceptora se limitó a un mínimo de 300 µL debido a que el diseño experimental impedía emplear volúmenes más pequeños.

Hay que destacar que en los dispositivos EME uno de los aspectos que debe considerarse es la posible electrolisis del agua, ya que la formación de burbujas y la consecuente generación de iones  $\text{OH}^-$  y  $\text{H}^+$  puede ocasionar cambios bruscos de pH tanto en la fase aceptora como en la donadora, que pueden afectar, en consecuencia, al rendimiento del proceso de extracción [17-20]. En este caso, se comprobó que la electrolisis en la fase aceptora conducía a un importante descenso del pH de la misma durante el proceso de extracción, lo que podría a priori ser especialmente significativo. Por tanto, se consideró el uso de diferentes disoluciones tampón para intentar asegurar un valor de pH prácticamente constante en esta fase aceptora. Igualmente, se estudió también la influencia de la electrolisis del agua en la fase donadora. Se comprobó que, después del proceso de extracción, se producía un importante incremento en el pH de la fase donadora hasta alcanzar un valor aproximado de pH 11. Sin embargo, este hecho tenía un efecto sinérgico positivo en el proceso de extracción debido a los valores de pKa de los analitos estudiados. A valores elevados de pH, los analitos se encuentran mayoritariamente en su forma iónica, lo que favorece su extracción formando par iónico con el carrier.

Así, la fase donadora conteniendo los analitos estudiados a una concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  sin control del pH (aproximadamente pH 4), se sometió al procedimiento EME aplicando un potencial de 100V durante 10 min. Por su parte, para ajustar el pH de la fase aceptora se emplearon disoluciones tampón acético/acetato, fosfato y amoníaco/amonio de concentración 100 mM para cubrir un rango de pH entre 4-10. Se empleó HCl para el ajuste de pH 2 y NaOH para pH 11, pH 12 y pH 13. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.6.



**Figura 3.6.** Influencia del pH de la fase aceptora.

Como puede observarse, las recuperaciones aumentan para todos los analitos cuando el pH se incrementa hasta un valor aproximadamente de 5.5. Para valores de pH superiores, las recuperaciones se mantienen prácticamente constantes. Por tanto, se empleó una disolución tampón acético/acetato 100 mM a pH 6 para ajustar el pH de la fase aceptora para el resto de experimentos, considerando así este pH como el óptimo de la fase aceptora.

Como ya se ha mencionado, no se realizó ningún ajuste sobre el pH de la fase donadora dado que el incremento de pH que sufre durante el proceso de extracción favorece la extracción de los analitos seleccionados.

### 3.5.4. Influencia del voltaje de extracción

El voltaje se estudió en un rango comprendido entre 10 y 200 V. Se observó que en ausencia de potencial los compuestos no se extraían. En cambio, como puede verse en la Figura 3.7, las recuperaciones de los compuestos aumentaban considerablemente con el incremento de voltaje hasta un valor máximo a 100 V. Para voltajes superiores a este valor, se producía un incremento del volumen de la fase aceptora. Por tanto, se

seleccionó un voltaje de 100 V como valor óptimo para llevar a cabo el procedimiento de extracción.

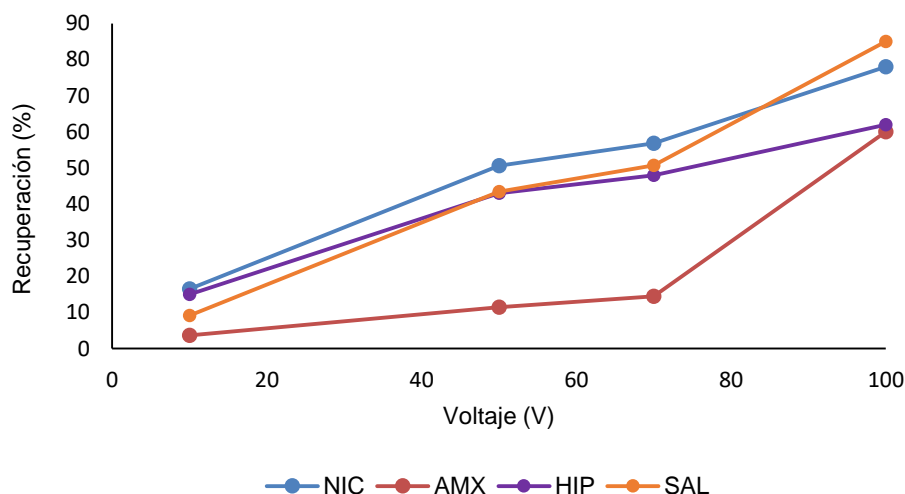


Figura 3.7. Influencia del voltaje de extracción.

### 3.5.5. Influencia del tiempo de extracción

El tiempo de extracción se estudió en un rango entre 5 y 15 minutos. Se observó que las recuperaciones de los compuestos aumentaban con el tiempo de extracción hasta los 10 minutos. Por encima de este tiempo, el volumen de la fase aceptora aumentaba, por lo que no se midió. Dada la naturaleza nanoestructurada de la membrana de nanofibras, la presencia de un sistema poroso nanométrico podría hacer relevante el flujo electrosmótico, permitiendo así el flujo de agua desde la fase donadora a la aceptora. Para tiempos de extracción inferiores a los 10 minutos, este hecho no afecta de forma significativa a la relación de volúmenes de fase. Por tanto, se empleó como tiempo óptimo un tiempo de extracción de 10 minutos.

### 3.5.6. Influencia del volumen de las fases donadora y aceptora

Otro de los factores que se estudió fue la relación de volúmenes de fase donadora/aceptora. En el caso de la fase aceptora, no podían probarse



volúmenes inferiores a 300  $\mu$ L debido al diseño del dispositivo experimental. Por tanto, fijando 300  $\mu$ L de fase aceptora, se probaron volúmenes de fase donadora que variaban entre 10 y 100 mL. Se observó que, para 10 mL de fase donadora se obtenían recuperaciones elevadas para todos los compuestos.

Adicionalmente, usando 10 mL de fase donadora, se probaron volúmenes crecientes de fase aceptora sin observar mejora en las recuperaciones obtenidas. Por tanto, se seleccionaron 300  $\mu$ L y 10 mL como volúmenes óptimos para las fases aceptora y donadora, respectivamente.

### **3.5.7. Influencia de la concentración de carrier**

Con objeto de evaluar la influencia de la concentración de carrier, se llevaron a cabo una serie de pruebas usando diferentes cantidades de carrier disueltas en la membrana líquida. De este modo, se probaron concentraciones comprendidas entre 2.5% y 7% (p/v) de Aliquat®336. Se observó que las recuperaciones aumentaban al aumentar la cantidad de carrier hasta un 5% (p/v), manteniéndose prácticamente constantes para cantidades superiores. Por tanto, se estableció como cantidad óptima del carrier un 5% (p/v).

### **3.5.8. Validación**

Teniendo en cuenta todas las condiciones experimentales previamente establecidas, las recuperaciones obtenidas para los analitos estudiados empleando el procedimiento EME propuesto fueron 77% para NIC, 60% para AMX, 62% para HIP y 85% para SAL.

Por tanto, las membranas de nanofibras Tiss®-OH podrían ser una elección adecuada como soporte para la extracción por electromembrana de compuestos ácidos de elevada polaridad. Adicionalmente, como se mencionó en el apartado 3.1, sus excelentes propiedades mecánicas, así como su versatilidad química, llevan a considerar este material como un soporte prometedor para la extracción de compuestos de naturaleza muy diferente.

Una vez optimizado el procedimiento EME usando este nuevo soporte nanoestructurado, se evaluaron la linealidad, sensibilidad y precisión del método. En la Tabla 3.3 se muestran los datos de calibración del método cromatográfico.

**Tabla 3.3.** Datos de calibración, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y recuperaciones de los analitos estudiados.

Analito	Rango lineal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Linealidad		LOD* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperación (%)
		(%)	( $R^2$ )			
NIC	373.3-4000.0	99.8	0.9976	112.0	373.3	77
AMX	1322.1-3000.0	98.9	0.9887	402.3	1322.1	60
HIP	706.0-3000.0	99.5	0.9946	211.8	706.0	62
SAL	781.7-3000.0	99.3	0.9926	234.5	781.7	85

\*LOD y LOQ de acuerdo a las recuperaciones efectivas.

El rango lineal y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada uno de los analitos estudiados se calcularon de acuerdo a la recuperación obtenida en la muestra final. LOD y LOQ se calcularon como 3 y 10 veces la relación señal ruido, respectivamente [21]. Por su parte, la linealidad (%) se calculó a partir de la pendiente de la recta de calibrado y su incertidumbre [22].

Como puede verse, se obtiene buena linealidad para todos los compuestos, entre 98.9% y 99.8%, así como buenos coeficientes de regresión. Los límites de detección (LODs) se encuentran entre  $112.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para NIC y  $402.3 \mu\text{g L}^{-1}$  para AMX, mientras que los límites de cuantificación (LOQs) se encuentran entre  $373.3 \mu\text{g L}^{-1}$  para NIC y  $1322.1 \mu\text{g L}^{-1}$  para AMX.

Asimismo, se evaluaron la repetibilidad y la precisión intermedia del método propuesto aplicando el procedimiento en un solo día a muestras de orina, así como en dos días diferentes durante tres semanas, respectivamente. Los %RSD obtenidos fueron 6-8% para la repetibilidad y 8-10% para la precisión intermedia.

A la vista de los parámetros de validación obtenidos, puede decirse que el método EME propuesto proporciona buen rendimiento en términos de precisión, linealidad, LODs, LOQs y recuperaciones de los analitos seleccionados.

### **3.5.9. Aplicación a muestras reales**

Por otra parte, se evaluó el procedimiento EME propuesto con este nuevo soporte nanoestructurado para la determinación de los analitos seleccionados en muestras reales y fortificadas de orina humana.

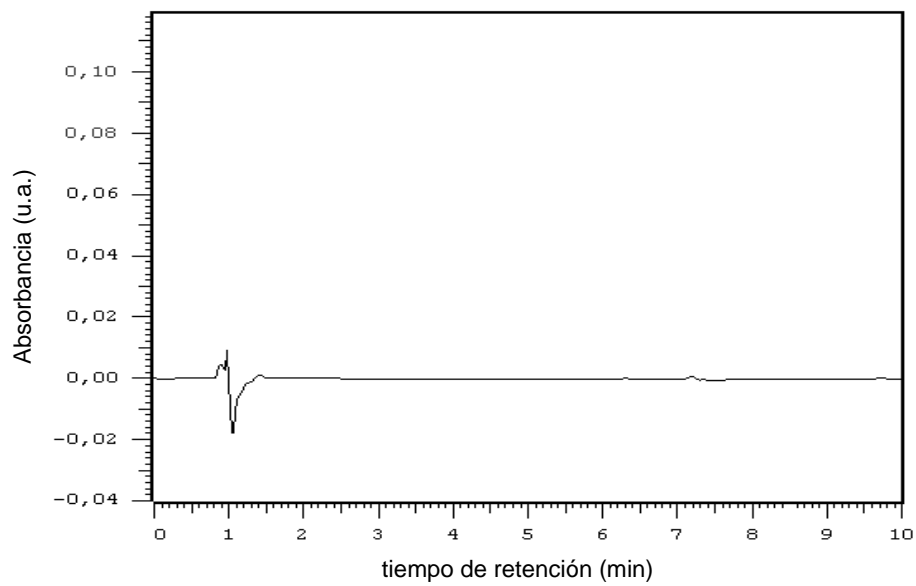
En primer lugar, muestras de orina, procedentes de voluntarios saludables, fueron microfiltradas (0.22  $\mu\text{m}$ ), dopadas a tres niveles de concentración con NIC, AMX, HIP y SAL y diluidas con agua ultrapura (1:100, v/v) y, posteriormente, sometidas al procedimiento EME descrito con anterioridad. Finalmente, los extractos obtenidos se inyectaron en el sistema cromatográfico, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 3.4. Como puede observarse, para una concentración de 50  $\text{mg L}^{-1}$  únicamente puede determinarse el NIC, ya que las señales obtenidas para el resto de compuestos se encuentran por debajo de los límites de cuantificación. Lo mismo ocurre en el caso de la amoxicilina para una concentración de 100  $\text{mg L}^{-1}$ . Para el resto de dopados, como puede observarse en la Tabla 3.4, existe concordancia entre la cantidad de cada analito dopada y la determinada por HPLC después del proceso de extracción. Las recuperaciones obtenidas se encuentran entre el 82% y el 98%, de acuerdo a las recuperaciones efectivas, es decir, teniendo en cuenta el rendimiento del método de extracción indicado en la sección de validación X.

**Tabla 3.4.** Recuperaciones (%) de NIC, AMX, HIP y SAL en muestras de orina humana dopadas usando el método EME/HPLC-DAD propuesto.

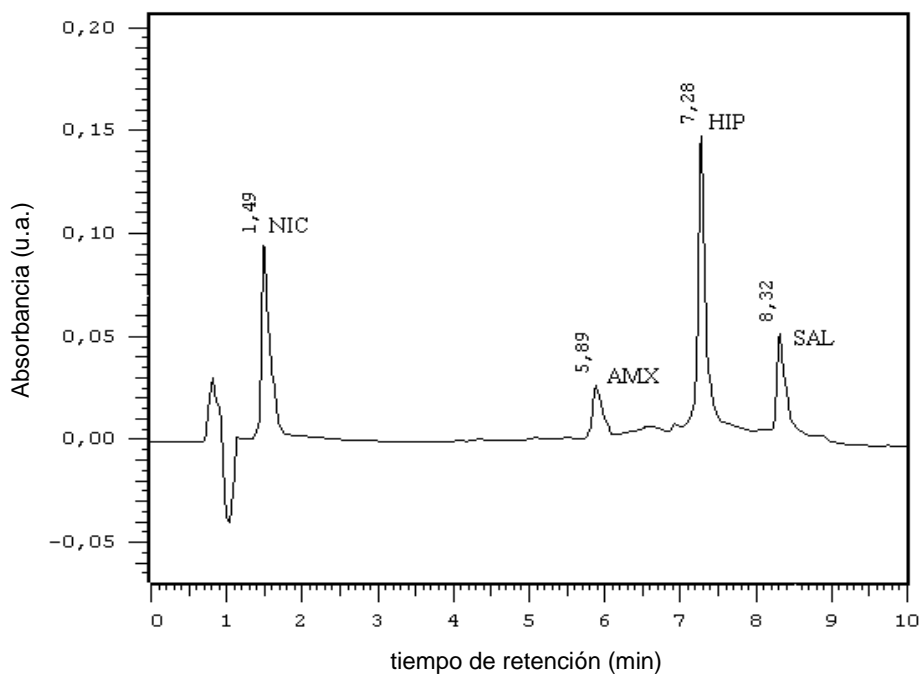
<b>Concentración en la orina original (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>NIC*</b>	<b>AMX*</b>	<b>HIP*</b>	<b>SAL*</b>
50	90.2	< LOQ	< LOQ	< LOQ
100	94.6	< LOQ	89.2	82.0
200	98.0	93.3	95.3	86.4

\*Media de tres determinaciones (%RSD < 6).

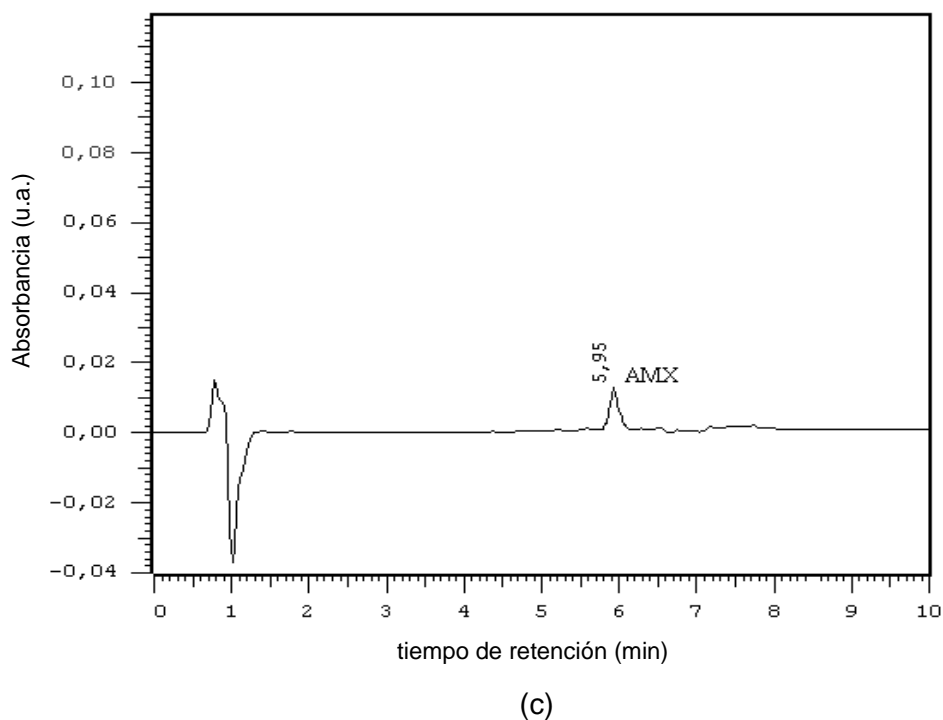
Por otra parte, se analizaron también muestras de orina recogidas después de la administración oral de un comprimido de 750 mg de amoxicilina. Estas muestras se tomaron a los 30 min y a las 7 horas de la ingesta del fármaco para su posterior análisis, observándose que, en el primer caso, es decir, a los 30 min de la ingesta, no se detectaba AMX en la orina. En cambio, en la orina recogida 7 horas después de la ingesta del fármaco, se determinó una cantidad de amoxicilina correspondiente al 56.8% de la dosis ingerida. Estos resultados se corresponden con el hecho de que el 60% de la ingesta de amoxicilina se excreta en la orina en un período comprendido entre 6 y 8 horas [23]. La Figura 3.8 muestra los cromatogramas obtenidos correspondientes a un blanco de orina humana (a), orina humana dopada con 200 mg L<sup>-1</sup> (b) y orina humana recogida 7 horas después de la ingesta de 750 mg de amoxicilina (c). Como puede observarse, se obtienen buenas líneas base y picos adecuados para todas las muestras analizadas. Por tanto, según los resultados obtenidos, puede decirse que el procedimiento EME propuesto es adecuado para la extracción de los analitos estudiados en muestras de orina humana.



(a)



(b)



**Figura 3.8.** Cromatogramas HPLC de muestras de orina humana sometidas al procedimiento EME. (a) Blanco de orina humana; (b) Orina humana dopada con 200 mg L<sup>-1</sup>; (c) Orina humana recogida 7 horas después de la administración oral de 750 mg de AMX.

## REFERENCIAS

- [1] NanoMyP® Tiss®-Membranes, (<http://nanomyp.com/en/page.cfm?id=42&title=tiss%C2%AE-membranes>) (accessed 17.07.18).
- [2] V. Tak, A. Kabra, D. Pardasani, D.R. Goud, R. Jain, D.K. Dubey, A glass capillary based microfluidic electromembrane extraction of basic degradation products of nitrogen mustard and VX from water, *J. Chromatogr. A* 1426 (2015) 16-23.
- [3] N. Drouin, S. Rudaz, J. Schappler, New supported liquid membrane for electromembrane extraction of polar basic endogenous metabolites, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 159 (2018) 53-59.

- [4] S. Sedehi, H. Tabani, S. Nojavan, Electro-driven extraction of polar compounds using agarose gel as a new membrane: determination of amino acids in fruit juice and human plasma samples, *Talanta* 179 (2018) 318-325.
- [5] E. Fernández, L. Vårdal, L. Vidal, A. Canals, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Complexation-mediated electromembrane extraction of highly polar basic drugs—a fundamental study with catecholamines in urine as model system, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 4215-4223.
- [6] C. Basheer, J. Lee, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, H.K. Lee, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs at neutral sample pH: a novel electro-mediated microextraction approach, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6661–6667.
- [7] A.A. Sauve, NAD and vitamin B3: from metabolism to therapies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 (2008) 883–893.
- [8] H. Yuan, J. Wan, L. Li, P. Ge, H. Li, L. Zhang, Therapeutic benefits of the group B3 vitamin nicotinamide in mice with lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis, *Pharmacol. Res.* 65 (2012) 328–337.
- [9] E T Bodor, S Offermanns, Nicotinic acid: an old drug with a promising future, *Br J Pharmacol.* 153 (2008) S68–S75.
- [10] M.B. Villanueva, H. Jonai, S. Kanno, Y. Takeuchi, Dietary sources and background levels of hippuric acid in urine: comparison of Philippine and Japanese levels, *Ind. Health*, 32 (1994) 239-246.
- [11] M.S. Goligorsky, Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney disease: a retrospective and what the future may hold, *Kidney Res. Clin. Pract.* 34 (2015) 76-82.
- [12] M. An, Y. Gao, Urinary biomarkers of brain diseases, *Genom. Proteom. Bioinforma.* 13 (2015) 345-354.
- [13] S. Decharat, Hippuric Acid levels in paint workers at steel furniture manufacturers in Thailand, *Saf. Health Work* 5 (2014) 227-233.

- [14] T. Kawamoto, M. Koga, T. Oyama, Y. Kodama, Habitual and genetic factors that affect urinary background levels of biomarkers for organic solvent exposure, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30 (1996) 114-120.
- [15] L.H. Shen, H.N. Wang, P.J. Chen, C.X. Yu, Y.D. Liang, C.X. Zhang, The analytical determination and electrochemiluminescence behavior of amoxicillin, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 199–205.
- [16] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes, New concept for rapid sample preparation of biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 183-190.
- [17] N. Drouin, S. Rudaz, J. Schappler, Dynamic-electromembrane extraction: a technical development for the extraction of neuropeptides, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5308-5315.
- [18] A. Slampová, P. Kubán, P. Bocek, Additional considerations on electrolysis in electromembrane extraction, *J. Chromatogr. A* 1429 (2016) 364-368.
- [19] P. Kubán, P. Bocek, The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extraction: the role of acceptor solution, *J. Chromatogr. A* 1398 (2015) 11-19.
- [20] A. Slampová, P. Kubán, P. Bocek, Quantitative aspects of electrolysis in electromembrane extractions of acidic and basic analytes, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015) 92–100.
- [21] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4<sup>th</sup> ed., Prentice Hall, London, 2000.
- [22] L. Cuadros-Rodríguez, A.M. García-Campaña, J.M. Bosque-Sendra, Statistical Estimation of Linear Calibration Range, *Anal. Lett.* 29 (1996) 1231-1239.
- [23] S.P. Kaur, R. Rao, S. Nanda, Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2011) 30-37.



## CAPÍTULO 4.

Membranas de inclusión polimérica (PIMs)

---



## SUMMARY

In this section, polymer inclusion membranes (PIMs) are proposed as supports in electromembrane extraction (EME).

Synthesis of PIMs was optimized to a composition of 29% (w/w) of cellulose triacetate (CTA) as base polymer and 71% (w/w) of Aliquat®336 as cationic carrier. Membranes of different thickness were synthesized and tested.

EME procedure using these PIMs was implemented for the first time, to our knowledge, for the simultaneous extraction of four non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (salicylic acid (SAL), ketoprofen (KTP), naproxen (NAX) and ibuprofen (IBU)) and four highly polar acidic drugs (nicotinic acid (NIC), amoxicillin (AMX), hippuric acid (HIP) and anthranilic acid (ANT)). Posterior HPLC separation of the extracted analytes was developed with diode array detection (UV-DAD).

Influence on the EME procedure of the organic solvent used as SLM, volume and pH of donor and acceptor solutions, voltage and extraction time was investigated.

Optimal conditions were established with PIMs (29% (w/w) of CTA and 71% (w/w) of Aliquata®336) of 25 µm thickness and 6 mm diameter as support of 1-octanol liquid membrane. Recoveries in the 81–34% range were obtained when target analytes were extracted from an aqueous donor solution (pH 4) into an aqueous acceptor solution (pH 10) applying 50 V for 30 minutes.

Finally, the EME procedure was applied successfully to the analysis of human urine samples.



#### 4.1. DESCRIPCIÓN DEL SOPORTE

Las membranas de inclusión polimérica (*Polymer inclusion membranes*, PIMs) son membranas homogéneas y consistentes, compuestas, generalmente, por un agente extractante (carrier), un polímero base, comúnmente cloruro de polivinilo (PVC) o triacetato de celulosa (CTA), y un plastificante o modificador. La fuerza mecánica de la membrana, así como su resistencia difusiva, la proporciona el polímero base. Por otro lado, el carrier o transportador actúa, esencialmente, como intercambiador de iones o agente complejante, al unirse a las especies de interés y transportarlas a través del PIM. El gradiente de concentración del complejo especies-carrier o pares iónicos formados en la membrana es el responsable del transporte de las especies a través de la misma. Por su parte, el plastificante proporciona no sólo elasticidad y flexibilidad a la membrana, sino que también actúa como disolvente. La presencia del plastificante contribuye, además, a mejorar la compatibilidad de los diferentes componentes de la membrana [1, 2]. Asimismo, el carrier puede actuar también como plastificante y, en ese caso, no se necesita el uso de un plastificante adicional. De forma ocasional, se puede añadir otro componente a la membrana, llamado modificador, con objeto de mejorar la solubilidad de la especie extraída en la fase líquida de la membrana.

En los últimos años sus aplicaciones se han centrado fundamentalmente en la detección química, actuando como electrodos selectivos de iones (*ion-selective electrodes*, ISEs) [3].

La composición de los PIM es esencial en sus propiedades físicas y químicas, así como en la selectividad de la membrana. Varios investigadores han estudiado la eficiencia del transporte a través del PIM. Así, se sabe que la naturaleza y los componentes del PIM pueden mejorar el transporte de las especies de interés a través de la membrana, haciéndolo más rápido [4].

Estas características, junto con la simplicidad de operación, el uso mínimo de sustancias químicas peligrosas y la flexibilidad, hacen de los PIMs una más que interesante alternativa frente a los soportes tradicionales

para las membranas líquidas. De esta forma, pueden encontrarse en la literatura varios trabajos donde se describe el uso de PIMs como membranas alternativas en sistemas de extracción por electromembrana (EME). Así, se han empleado eficazmente en la extracción de aniones orgánicos e inorgánicos, como propanosulfonato, heptanosulfonato, decanosulfonato, tetraetilamonio, tetrabutilamonio y tetrapentilamonio) [4-8].

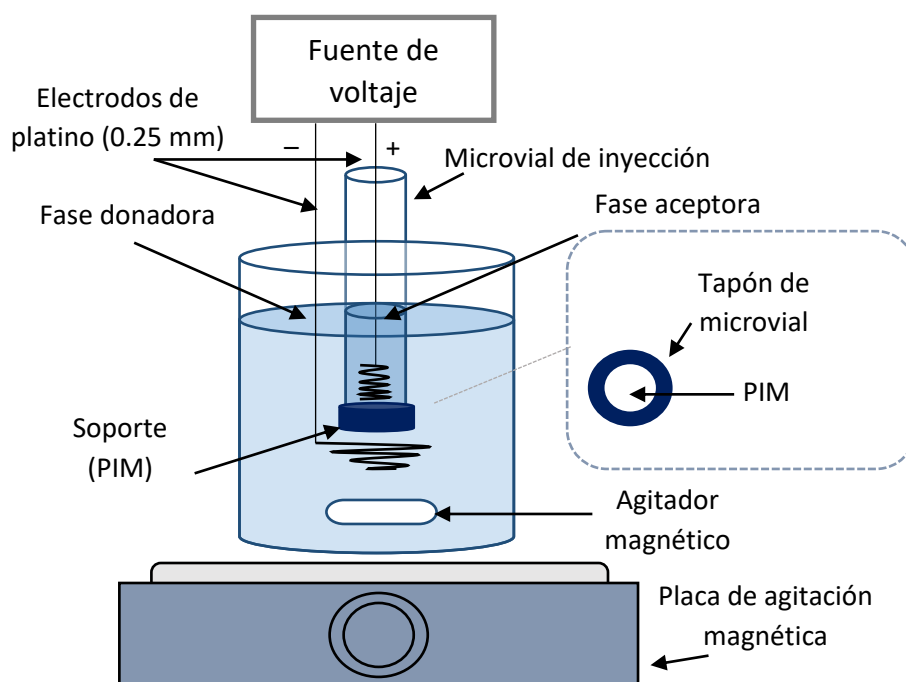
## **4.2. SÍNTESIS**

La preparación de los PIMs se llevó a cabo, con algunas modificaciones, siguiendo el procedimiento propuesto por See et al. [5, 6]. Así, la síntesis se realizó disolviendo 0,6 g de triacetato de celulosa (CTA) en 30 ml de diclorometano (DCM) e introduciendo la mezcla en un baño de ultrasonidos hasta disolución total.

Por otra parte, se pesa la cantidad de Aliquat®336 deseada y se añade a la disolución anterior. Tras la homogenización de la disolución resultante, se vierte un determinado volumen (en función del espesor que se desee) sobre una placa Petri de vidrio de 90 mm. Una vez evaporado el disolvente, se obtienen films de diferente espesor y contenido en CTA que se separan fácilmente de la placa de vidrio.

## **4.3. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL**

El proceso de extracción por electromembrana con membranas de inclusión polimérica se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento y dispositivo experimental descritos anteriormente para los tejidos nanoestructurados (apartado 3.2). El esquema del dispositivo experimental empleado se representa en la Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Dispositivo experimental empleado en el procedimiento EME con PIMs.

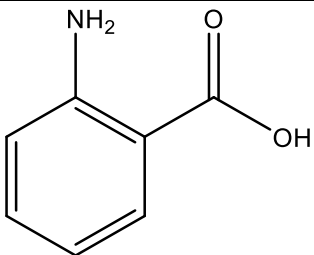
Al igual que con los soportes anteriores, se estudió la influencia en el procedimiento de extracción de factores como la composición del PIM, el espesor de la membrana, el disolvente orgánico empleado como SLM, el pH, el voltaje, el tiempo y el volumen de fases aceptora y donadora. En todos los casos, el procedimiento EME se aplicó a la extracción simultánea de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y compuestos ácidos de elevada polaridad.

Una vez finalizada la extracción, se recogió la fase aceptora con una microjeringa y se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  en el sistema cromatográfico.

#### 4.4. COMPUESTOS ESTUDIADOS Y DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

Las membranas de inclusión polimérica (PIMs) se emplearon en la determinación simultánea de dos familias de compuestos. Se seleccionaron cuatro antiinflamatorios no esteroideos, AINEs, (ácido salicílico (SAL), ketoprofeno (KTP), naproxeno (NAX) e ibuprofeno (IBU)) y cuatro compuestos ácidos de elevada polaridad (ácido nicotínico (NIC), amoxicilina (AMX), ácido hipúrico (HIP) y ácido antranílico (ANT)), cuyas características se han descrito ya en las secciones 2.6 y 3.3, respectivamente. En este caso, además, se incorpora un nuevo compuesto ácido de carácter polar, como es el ácido antranílico (ANT), cuya estructura y características químicas se indican en la Tabla 4.1. El ácido antranílico es un aminoácido aromático con un importante papel en determinados procesos químicos y bioquímicos. Se emplea en la síntesis de medicamentos biológicamente activos, así como en la fabricación de colorantes azoicos y en la determinación de iones metálicos [9]. Asimismo, se trata de un intermediario en el metabolismo del triptófano, por lo que constituye un metabolito endógeno del ser humano [10].

**Tabla 4.1.** Estructura y características del ácido antranílico.

<p><b>Ácido antranílico</b> <i>2-aminobenzoic acid</i> <math>C_7H_7NO_2</math> PM= 137.138 g/mol Número CAS: 118-92-3 <math>pK_a= 2.11</math> <math>\log P= 1.2</math></p>	
--	--

Se trata de la primera vez, según nuestro conocimiento, que se desarrolla un procedimiento EME para la extracción simultánea de ambas familias de compuestos, lo cual supone un hecho destacable, dada las diferentes características y propiedades que presentan los analitos seleccionados.



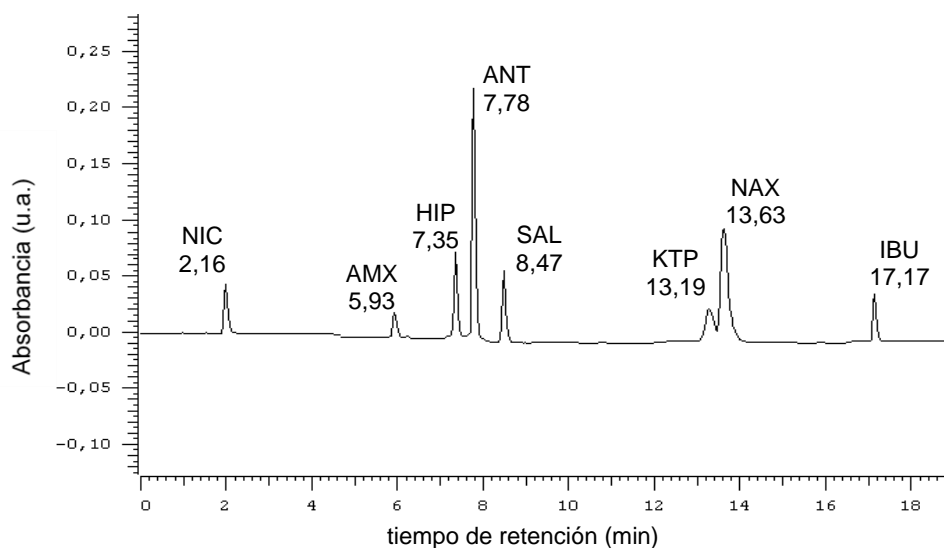
La determinación de dichos compuestos se llevó a cabo, al igual que con los soportes anteriores, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta de diodos en fila (HPLC-DAD). En este caso, se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución LabChrom® VWR-Hitachi (Barcelona, España) equipado con una bomba cuaternaria L-7100 y un detector UV-Visible de diodos en fila L-7455, con inyección automática de la muestra (20 µL) empleando un automuestreador L-2200.

Para la separación cromatográfica se empleó una columna LiChroCART® 75-4 Purospher® STAR RP-18e 3 µm (75 mm x 4 mm d.i.) (VWR, Darmstadt, Alemania) equipada con una precolumna Kromasil® 100 Å, C18, 5 µm (15 mmx4.6 mm d.i.) (Scharlab S.L., Barcelona, España) y termostaticada a 20°C. Se llevó a cabo una elución en gradiente a flujo constante de 0.8 mL min<sup>-1</sup> empleando una fase móvil consistente en una mezcla de ácido fórmico al 0.05% (v/v) (componente A) y acetonitrilo (componente B). Las condiciones cromatográficas para la separación simultánea de las dos familias de compuestos seleccionadas se indican en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Condiciones cromatográficas para la elución en gradiente de los compuestos seleccionados. A: ácido fórmico 0.05% (v/v), B: Acetonitrilo (ACN).

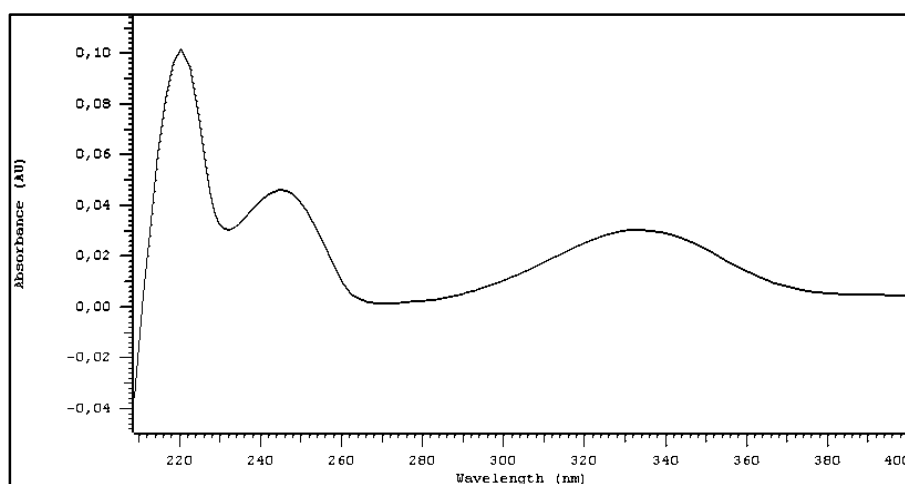
Tiempo (min)	% A	% B
0	99	1
3	90	10
4	90	10
4,1	60	40
12	60	40
17	0	100
19	0	100

Haciendo uso de las condiciones de separación recogidas en la Tabla 4.2, se obtiene el cromatograma que se representa en la Figura 4.2.



**Figura 4.2.** Cromatograma de los AINEs y compuestos polares seleccionados.

Para la detección UV-DAD, se usaron las longitudes de onda óptimas seleccionadas a partir de los espectros de absorción de los compuestos analizados, tal como se indica en las secciones 2.7 y 3.4. En la Figura 4.3, puede observarse el espectro de absorción del ácido antranílico. Así, las longitudes de onda empleadas fueron 260 nm para NIC, 230 nm para AMX y NAX, 235 nm para HIP y SAL, 255 nm para KTP y 224 nm para ANT e IBU.



**Figura 4.3.** Espectro de absorción del ácido antranílico (ANT).

## 4.5. RESULTADOS

### 4.5.1. Ensayos preliminares

#### 4.5.1.1. Optimización de la síntesis de PIMs

En primer lugar, se llevaron a cabo una serie de pruebas con objeto de optimizar la síntesis de una membrana de inclusión polimérica con características apropiadas para su empleo como soporte de la membrana líquida en procedimientos EME. Se estudiaron diferentes proporciones de polímero y plastificante en la composición del PIM. Así, se probaron distintas cantidades de triacetato de celulosa (75-600 mg) siguiendo algunos de los procedimientos descritos en la bibliografía [5, 6], y se disolvieron en cantidades variables de diclorometano (20 y 30 mL). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con estos ensayos previos y a fin de conseguir un PIM con las propiedades físicas óptimas, en términos de espesor y flexibilidad, así como una buena eficiencia de extracción, en base a la obtención de buenas recuperaciones para los compuestos estudiados, se seleccionó como síntesis óptima la disolución de 600 mg de CTA en 30 mL de DCM.

Por otro lado, existen evidencias bibliográficas [1-2, 4] acerca de que la presencia de plastificante condiciona tanto la elasticidad como la consistencia de la membrana. Por tanto, a fin de encontrar la composición óptima del PIM, se probaron también diferentes proporciones de fosfato de tris (2-etilhexilo) (TEHP) como plastificante. Se seleccionó TEHP como plastificante atendiendo a trabajos publicados en los que se sintetizan y se emplean PIMs con características similares para su empleo en sistemas EME [5, 11]. Las proporciones de TEHP estudiadas fueron 2.5%, 5% y 10% (p/v). Se observó que al añadir TEHP a la síntesis del PIM, independientemente de la proporción empleada, las membranas obtenidas tenían poca consistencia, por lo que se optó por no añadir plastificante a la síntesis de las mismas. Realmente, la ausencia de TEHP en la membrana estaba justificada por la presencia en la síntesis de otro componente que ejercía la misma función plastificante, como es el carrier catiónico Aliquat®336.

De la misma forma, la proporción de carrier en la membrana es también un aspecto a tener en cuenta, ya que puede jugar un papel importante en el transporte de los analitos a través de la SLM en los procedimientos EME. Así pues, se estudiaron diferentes cantidades de Aliquat®336 como carrier catiónico en la composición del PIM (1%, 2.5%, 5%, 7% and 10% (p/v)).

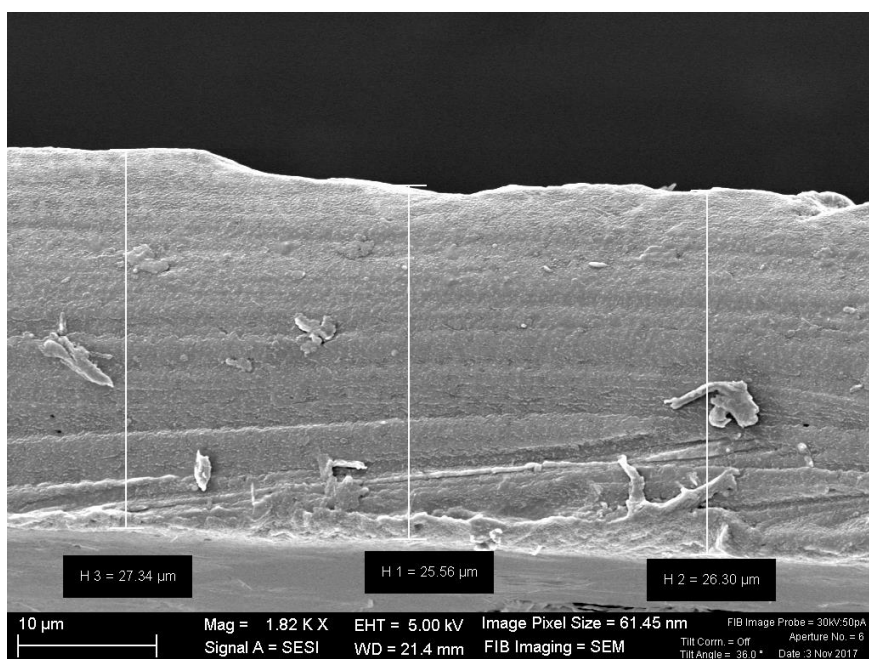
Dada la naturaleza ácida de los compuestos estudiados, la presencia en la membrana de Aliquat®336 (sal de amonio cuaternaria), favorece la extracción como par iónico de dichos compuestos. Se observó que, para proporciones inferiores al 5% (p/v) de Aliquat®336 se obtenían recuperaciones muy bajas para todos los compuestos (10-15%). Estos valores mejoraban ligeramente para proporciones de carrier por encima del 5% (p/v), obteniéndose en ese caso recuperaciones del 10-35%. En cambio, para un 5% (p/v) de Aliquat®336, las recuperaciones de los compuestos seleccionados alcanzaban valores comprendidos entre el 34 y 81%, por lo que se seleccionó un 5% (p/v) como cantidad óptima de carrier.

Así, una vez optimizadas las proporciones de triacetato de celulosa y de Aliquat®336, la síntesis de las membranas de inclusión polimérica se llevó a cabo disolviendo 0.6g de CTA en 30 mL de DCM, favoreciendo la disolución con un baño de ultrasonidos. A continuación, una vez disuelto, se pesó y añadió la cantidad de Aliquat®336 correspondiente a un 5% (p/v), agitando hasta obtener una mezcla homogénea.

Por último, con objeto de sintetizar membranas de diferente espesor, se vertieron volúmenes variables (2.5, 5 y 10 mL) de la mezcla anterior en placas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro. Una vez evaporado el disolvente, se obtuvieron membranas con espesores comprendidos entre 25 y 80  $\mu\text{m}$ . Para determinar el espesor correspondiente a cada una de las membranas, se realizaron medidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), revelando espesores de  $26.5 \pm 0.9$ ,  $50.3 \pm 0.8$  y  $80.3 \pm 0.7$   $\mu\text{m}$  para cada uno de los volúmenes anteriores, respectivamente. Haciendo uso de cada una de ellas como soporte de la SLM, se llevó a cabo el estudio de

la influencia del espesor de la membrana en el proceso de extracción por electromembrana. Se observó que la membrana de mayor espesor conducía a recuperaciones muy bajas para todos los compuestos, entre un 2-10%, mientras que la de menor espesor era la que proporcionaba mejor eficacia. Como conclusión, se puede decir que el rendimiento de la extracción mejora con el descenso en el espesor del soporte.

Como resultado de estos ensayos previos, se estableció que el PIM óptimo, en términos de eficacia de extracción, es una membrana de  $26.5 \pm 0.9$   $\mu\text{m}$  de espesor (obtenida para un volumen de 2.5 mL de síntesis vertida en la placa Petri de vidrio) con un 29% (p/p) de CTA y un 71% (p/p) de Aliquat®336, una vez evaporado por completo todo el disolvente. La Figura 4.4 muestra la imagen SEM correspondiente al PIM de menor espesor.



**Figura 4.4.** Imagen SEM de una sección de la membrana de menor espesor.

#### 4.5.1.2. Elección del disolvente orgánico como SLM

Se probaron diferentes disolventes como membranas líquidas soportadas: 1-octanol, dihexil éter, 2-etilnitrobenzoceno, 1-heptanol, nitrofenil octil éter (NPOE) y N,N-dimetilformamida. La DMF se descartó para su

empleo ya que dañaba la membrana. En cuanto al resto de disolventes no se apreciaron diferencias significativas en términos de enriquecimiento de los compuestos. Por tanto, se empleó 1-octanol como SLM para el resto de ensayos atendiendo a los buenos resultados obtenidos anteriormente en trabajos previos desarrollados en el seno del grupo de investigación [11-13].

#### 4.5.2. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora

El pH de las fases aceptora y donadora se optimizó realizando extracciones durante 10 minutos y aplicando un potencial de 50 V.

Para estudiar la composición de la fase aceptora, se probaron cinco valores de pH: 2, 4, 6, 10 y 12. Para pH 2 se empleó una disolución de ácido acético 5,69 M. Para pH 4 y pH 6 se empleó una disolución tampón CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa 100 mM. El pH 10 se ajustó con una disolución tampón NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl 100 mM y para pH 12 se empleó una disolución de NH<sub>3</sub> 100 mM.

En la Figura 4.5 se muestran las recuperaciones obtenidas en cada caso.

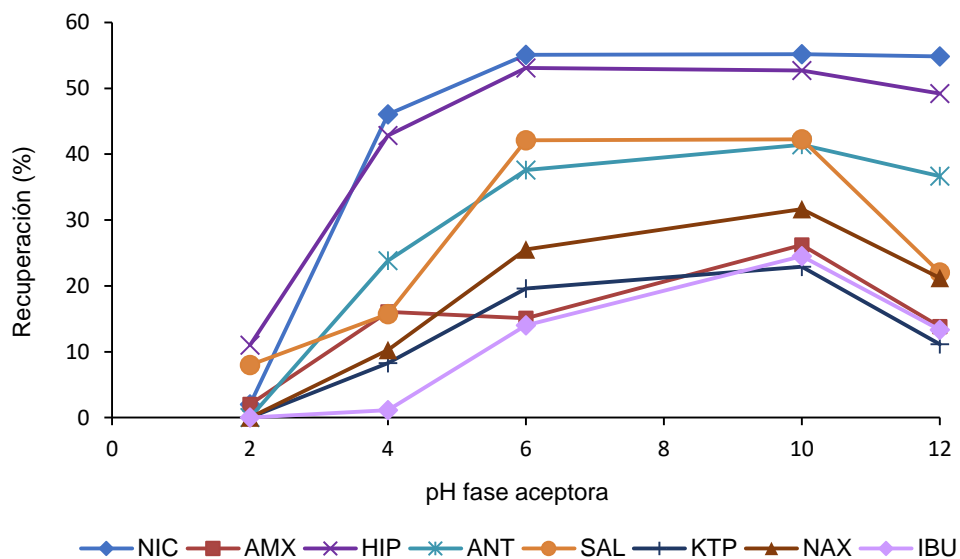


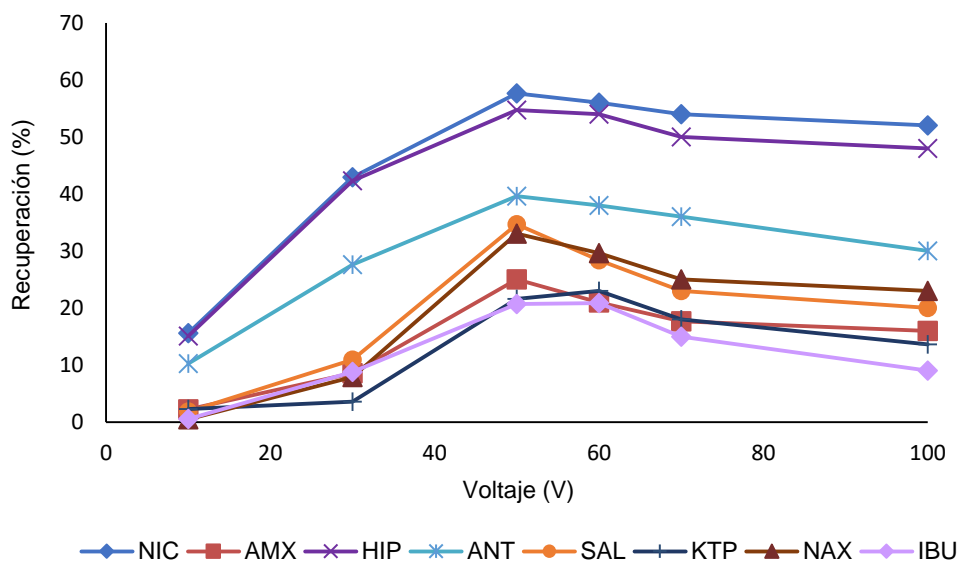
Figura 4.5. Influencia del pH de la fase aceptora.

Como puede observarse, cuando la extracción se lleva a cabo con un pH 2 para la fase aceptora, se obtienen recuperaciones muy bajas para todos los compuestos. A medida que se incrementa el pH, las recuperaciones aumentan de forma general para la mayoría de los compuestos, alcanzando un valor máximo a pH 10. Por encima de pH 10, los valores de las recuperaciones se mantienen constantes (NIC) o disminuyen (resto de compuestos). Por tanto, se seleccionó pH 10 como valor óptimo para el pH de la fase aceptora.

De la misma manera, se llevó a cabo la optimización del pH de la fase donadora, para lo cual se fijó el pH de la fase aceptora a pH 10 con tampón  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$  100 mM. En este caso, se probaron tres valores de pH: 4, 6 y 10. En el caso de pH 4, éste es el valor resultante de la disolución acuosa de los analitos. Para el ajuste del pH 6 y pH 10, se emplearon las disoluciones tampón mencionadas anteriormente. Cuando el proceso de extracción se lleva a cabo a pH 6 y pH 10 en la fase donadora, se producía un brusco incremento en la intensidad de corriente generada como consecuencia del empleo de disoluciones tampón en ambas fases, lo que provocaba la inestabilidad de la fase aceptora, ocasionando que ni el volumen ni el pH de la misma se mantuvieran constantes. Por este motivo, se estableció pH 4 como valor óptimo para la fase donadora, siendo éste el valor resultante de la disolución acuosa de los analitos seleccionados.

#### **4.5.3. Influencia del voltaje de extracción**

Se optimizó, asimismo, el potencial aplicado durante el procedimiento de extracción. Se probaron voltajes de 10, 30, 50, 60, 70 y 100 V para extracciones de 10 minutos, empleando como fases aceptora y donadora las indicadas anteriormente como óptimas, es decir, ajustando el pH a 10 y 4, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.6.



**Figura 4.6.** Influencia del potencial aplicado.

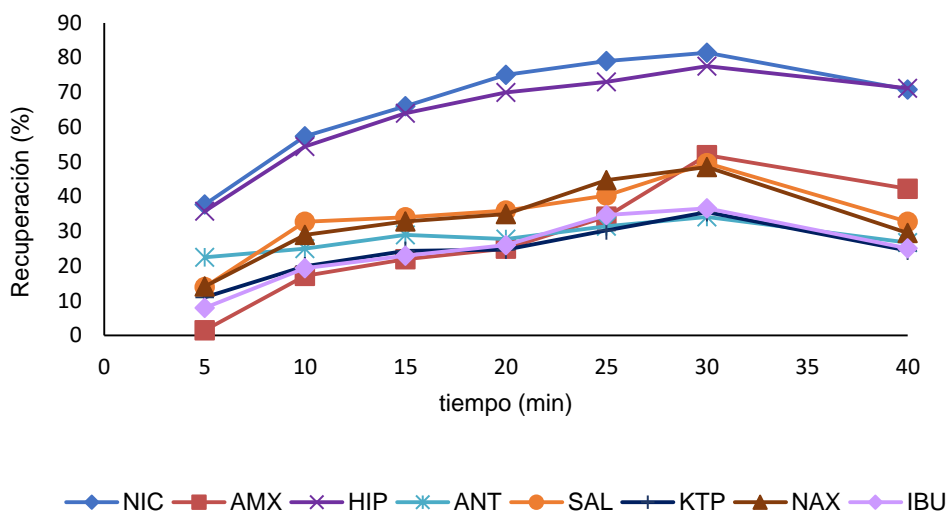
Como puede observarse, las recuperaciones aumentan considerablemente de 10 a 50 V para todos los compuestos. A partir de 50 V, los valores disminuyen ligeramente o se mantienen constantes hasta 100 V. Por tanto, se seleccionó 50 V como el voltaje óptimo en el procedimiento EME.

#### 4.5.4. Influencia del tiempo de extracción

Para llevar a cabo la optimización del tiempo de extracción, se realizaron extracciones durante tiempos variables (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 minutos). En todas estas extracciones se aplicó un potencial de 50 V, valor óptimo obtenido anteriormente.

Las recuperaciones obtenidas para los compuestos estudiados se muestran en la Figura 4.7.





**Figura 4.7.** Influencia del tiempo de extracción.

Se observa que de 5 a 10 min, las recuperaciones aumentan para todos los compuestos. Entre 10 y 30 min, la tendencia de los compuestos es variable, aunque las recuperaciones aumentan en todos los casos hasta un valor máximo para 30 min. Por encima de este tiempo, las recuperaciones disminuyen, por lo que se eligieron 30 minutos para el proceso de extracción por electromembrana.

#### 4.5.5. Influencia del volumen de las fases donadora y aceptora

Por último, se llevó a cabo la optimización del volumen de las fases aceptora y donadora, para ver su influencia en la eficacia de extracción, en términos de recuperaciones y factores de enriquecimiento de los compuestos analizados.

Dada las características del dispositivo experimental empleado para llevar a cabo los procedimientos de extracción, el volumen de la fase aceptora no podía ser superior ni inferior a 300  $\mu\text{L}$ , por lo que únicamente se estudió el volumen de fase donadora. Así, fijando el volumen de fase aceptora a 300  $\mu\text{L}$ , se probaron 5, 10, 25 y 50 mL de disolución donadora.

Se observó que, a medida que aumentaba el volumen de la fase donadora, se incrementaban los factores de enriquecimiento de los compuestos como consecuencia del incremento en la relación de volúmenes de fases. Sin embargo, por encima de 10 mL, las recuperaciones de los analitos empeoraban entre un 20% y un 50% cuando se empleaban 25 y 50 mL, respectivamente. Una posible explicación podría ser que a mayor volumen de disolución donadora, la cantidad de analito disponible es también mayor (para una misma concentración), por lo que la SLM podría saturarse impidiendo el transporte de los compuestos y, en consecuencia, provocando un descenso en las recuperaciones de los mismos.

Por tanto, se seleccionó un volumen de 10 mL para la fase donadora como volumen óptimo, al observarse mejores resultados en términos de recuperaciones.

#### **4.5.6. Validación y aplicación a muestras reales**

Una vez optimizados los distintos parámetros operacionales que afectan al proceso de extracción, las condiciones experimentales seleccionadas como óptimas consistían en 1-octanol como SLM, 10 mL de disolución donadora acuosa conteniendo los compuestos de interés (pH 4), 300  $\mu$ L de disolución tampón  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  a pH 10 como fase aceptora y un voltaje de 50 V durante 30 minutos con agitación constante a 300 rpm.

En estas condiciones experimentales óptimas se llevó a cabo la validación del método propuesto, evaluando la linealidad, sensibilidad, repetibilidad y precisión intermedia, así como su aplicación en el análisis de muestras reales. Para ello, se emplearon muestras de orina humana procedentes de voluntarios saludables que fueron microfiltradas (0.22  $\mu$ m), diluidas convenientemente y sometidas al procedimiento EME/HPLC-DAD propuesto. Se observó la existencia de efecto matriz debido a la presencia de muestras de orina, por lo que en primer lugar se llevó a cabo un calibrado por adición patrón. En la Tabla 4.3 se muestran el rango lineal y los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) para cada uno de los analitos estudiados, de acuerdo a la recuperación efectiva. Los límites de detección

y cuantificación se calculan como la relación señal/ ruido (3 veces para el LOD y 10 para el LOQ, respectivamente) [14].

**Tabla 4.3.** Datos de calibración, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y recuperación (%) para los analitos estudiados.

Analito	Rango lineal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Linealidad		LOD* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	R (%)
		(%)	( $R^2$ )			
NIC	96-500	97.0	0.995	29.0	96.0	81
AMX	333-500	96.9	0.993	100.0	333.0	52
HIP	71-500	97.8	0.997	21.0	71.0	78
ANT	207-500	97.1	0.997	62.0	207.0	34
SAL	61-500	98.0	0.998	18.0	61.0	50
KTP	131-500	96.0	0.993	39.0	131.0	35
NAX	124-500	96.6	0.998	37.0	124.0	48
IBU	62-500	97.7	0.998	19.0	62.0	37

Como puede observarse, se obtiene buena linealidad para todos los compuestos, con valores entre 96.0 para el KTP y 98.0 para SAL, expresados como % de linealidad. Los LODs obtenidos se encuentran entre  $18.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para SAL y  $100.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para AMX, mientras que los LOQs presentan valores entre  $61.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para SAL y  $333.3 \mu\text{g L}^{-1}$  para AMX. Por último, para evaluar la repetibilidad y la precisión intermedia, se realizaron extracciones en un sólo día, así como en dos días a la semana durante tres semanas, respectivamente. De esta forma, se obtuvieron valores para el %RSD entre 1-8% para la repetibilidad y entre 2-12% para la precisión intermedia.

Así, atendiendo a los parámetros de validación, se puede decir que los PIMs pueden emplearse de manera exitosa como soporte de la membrana líquida para la extracción simultánea de AINEs y compuestos ácidos muy polares.

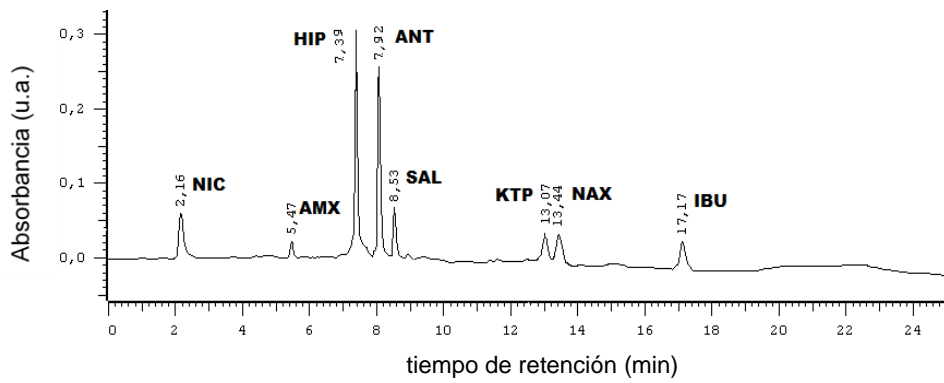
Adicionalmente, se analizaron cuatro de los fármacos estudiados como son NAX, AMX, IBU y SAL para su determinación en muestras de orina humana.

Atendiendo a la bibliografía, el 60% de la dosis de AMX ingerida se excreta en la orina en un periodo comprendido entre 6 y 8 horas [15]. En el caso del NAX, aproximadamente el 95% de este fármaco se excreta en la orina, siendo entre 66-92% como conjugados, <1% como 6-O-desmetil naproxeno y <1% como naproxeno [16]. La dosis habitual de IBU, suministrada como comprimidos, está entre 400 y 800 mg, tres veces al día. Este fármaco se elimina completamente 24 horas después de la última dosis. En un periodo entre 6 y 8 horas después de la ingesta de IBU, aproximadamente el 10% se excreta en la orina y más del 90% de la dosis ingerida se excreta como metabolitos o conjugados, siendo los metabolitos mayoritarios los compuestos hidroxilados y carboxilados [17, 18]. Por otra parte, después de la administración de ácido acetilsalicílico (ASA), se genera ácido salicílico (SAL) por hidrólisis [19], encontrándose los niveles habituales de SAL en orina en el rango de las centenas de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  [20].

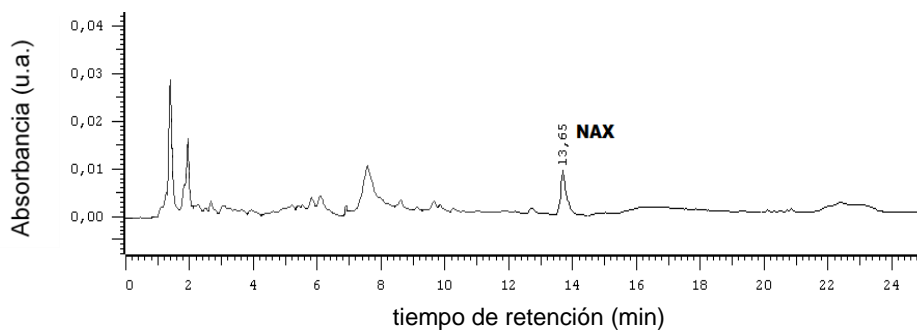
Las muestras de orina en este caso fueron suministradas por voluntarios saludables tras la administración de diferentes dosis de NAX, AMX, ASA e IBU. Las muestras fueron microfiltradas (0.22  $\mu\text{m}$ ), diluidas con agua ultrapura (1:500, v/v) y sometidas al procedimiento EME propuesto.

La Figura 4.8, muestra los cromatogramas correspondientes a una muestra de orina humana dopada con una mezcla de los compuestos estudiados de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de concentración (a); una muestra de orina humana recogida 3 horas después de la ingesta de 550 mg de naproxeno (b); una muestra de orina humana recogida 7 horas después de la ingesta de 600 mg de ibuprofeno (c); una muestra de orina humana recogida 7 horas

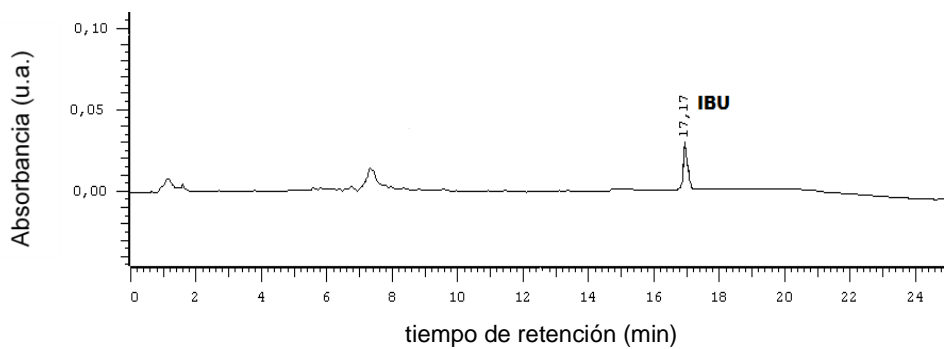
después de la ingesta de 750 mg de amoxicilina (d) y una muestra de orina humana recogida 4 horas después de la ingesta de 500 mg de ácido acetilsalicílico (e). Todos los cromatogramas muestran buena línea base y picos bien definidos para todos los analitos estudiados.



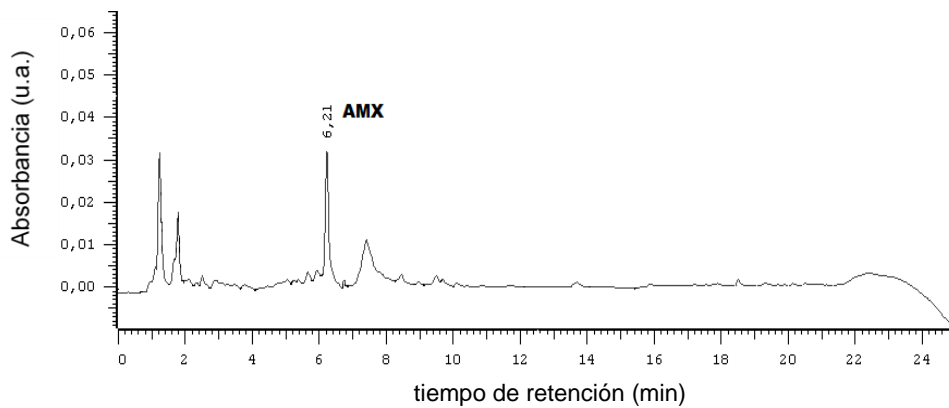
(a)



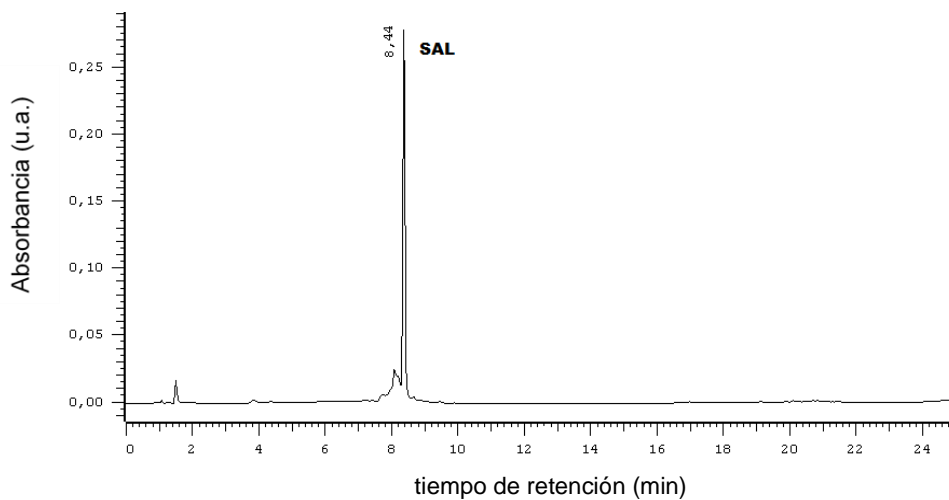
(b)



(c)



(d)



(e)

**Figura 4.8.** Cromatogramas del método de separación HPLC de muestras de orina humana sometidas al procedimiento EME. (a) orina dopada; (b) orina 3h después de la ingesta de NAX; (c) orina 7h después de la ingesta de IBU; (d) orina 7h después de la ingesta de AMX; (e) orina 4h después de la ingesta de ASA.

Los resultados obtenidos, una vez llevado a cabo el procedimiento EME en las muestras de orina, se recogen en la Tabla 4.4. Teniendo en cuenta el volumen de orina recogido, así como la recuperación efectiva del procedimiento EME para cada uno de los fármacos analizados (Tabla 4.3), las concentraciones de NAX, AMX, IBU y SAL encontradas en las muestras de orina humana se corresponden con las cantidades habituales excretadas indicadas en la literatura.

**Tabla 4.4.** Aplicación del procedimiento EME propuesto a muestras reales de orina humana.

<b>Analito</b>	<b>Dosis ingerida (mg)</b>	<b>Tiempo de excreción (h)</b>	<b>Concentración en la orina<sup>a</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>
AMX	750	7	165
IBU	600	7	259
NAX	550	3	319
SAL	500 <sup>b</sup>	4	711

<sup>a</sup>RSD < 7%

<sup>b</sup>Como ácido acetilsalicílico.

Aunque no se dispuso de muestras de orina que contuviesen HIP, ANT, KTP o NIC, los valores obtenidos para el LOQ en el procedimiento EME propuesto son mucho más bajos que los valores habituales de esos compuestos en muestras de orina humana. Según la bibliografía, estos niveles son aproximadamente 5 mg L<sup>-1</sup> para ANT, 160 mg L<sup>-1</sup> para KTP y 300–500 mg L<sup>-1</sup> para HIP [21-24]. Consecuentemente, se puede decir que el procedimiento EME propuesto podría aplicarse también de forma satisfactoria a la determinación de estos analitos en muestras reales de orina.

## REFERENCIAS

- [1] M.I. Vázquez, V. Romero, C. Fontàs, E. Anticó, J. Benavente, Polymer inclusion membranes (PIMs) with the ionic liquid (IL) aliquat 336 as extractant: effect of base polymer and IL concentration on their physical-chemical and elastic characteristics, *J. Membr. Sci.* 455 (2014) 312-319.
- [2] M.I.G.S. Almeida, R.W. Cattrall, S.D. Kolev, Recent trends in extraction and transport of metal ions using polymer inclusion membranes (PIMs), *J. Membr. Sci.* 415-416 (2012) 9-23.

- [3] R.W. Cattrall, Chemical sensors, in: R.G. Compton (Ed.), Oxford Chemistry Primers, 52 Oxford University Press, New York, 1997.
- [4] H.H. See, P.C. Hauser, Electro-driven extraction of low levels of lipophilic organic anions and cations across plasticized cellulose triacetate membranes: effect of the membrane composition, *J. Membr. Sci.* 450 (2014) 147-152.
- [5] H.H. See, P.C. Hauser, Automated electric-field-driven membrane extraction system coupled to liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8665-8670.
- [6] H.H. See, P.C. Hauser, Electric field-driven extraction of lipophilic anions across a carrier-mediated polymer inclusion membrane, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7507-7513.
- [7] H.H. See, S. Stratz, P.C. Hauser, Electro-driven extraction across a polymer inclusion membrane in a flow-through cell, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 79-84.
- [8] J. Schimdt-Marzinkowski, H.H. See, P.C. Hauser, Electric field driven extraction of inorganic anions across a polymer inclusion membrane, *Electroanalysis* 25 (2013) 1879-1886.
- [9] L. Zapala, J. Kalembkiewicz, E. Sitarz-Palczak, Studies on equilibrium of anthranilic acid in aqueous solutions and in two-phase systems: aromatic solvent-water, *Biophys. Chem.* 140 (2009) 91-98.
- [10] Safety evaluation of certain food additives. World Health Organization, Geneva, 2006.
- [11] N.A. Mamat, H.H. See, Development and evaluation of electromembrane extraction across a hollow polymer inclusion membrane, *J. Chromatogr. A* 1406 (2015) 34-39.
- [12] C. Román-Hidalgo, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, M.J. Martín-Valero, M.A. Bello-López, Agar films containing silver nanoparticles



as new support for electromembrane extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1519-1525.

[13] M. Ramos-Payán, M.A. Bello-López, R.M. Fernández-Torres, M. Villar-Navarro, M. Callejón-Mochón, Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples, *Talanta* 85 (2011) 394-399.

[14] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed., Prentice Hall, London, 2000.

[15] S.P. Kaur, R. Rao, S. Nanda, Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2011) 30-37.

[16] R. Runkel, M. Chaplin, G. Boost, E. Segre, E. Forchiell, Absorption, distribution, metabolism and excretion of naproxen in various laboratory animals and human subjects, *J. Pharm. Sci.* 61 (1972) 703-708.

[17] E.J. Antal, C.E. Wright, B.L. Brown, K.S. Albert, L.C. Aman, N.W. Levin, The influence of hemodialysis on the pharmacokinetics of ibuprofen and its major metabolites, *J. Clin. Pharmacol.* 26 (1986) 184-190.

[18] B.G. Katzung, D.E. Furst, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics, drugs used in gout*, in: *Basic and clinical pharmacology*, 7th Ed., Appliton and Lang Stamford, Connecticut, 1998.

[19] B.E. Cham, J.H.M. Dykman, F. Bochner, Urinary excretion of aspirin, *Br. J. Clin. Pharmac.* 14 (1982) 562-564.

[20] A.P. Pagani, G.A. Ibañez, Second-order multivariate models for the processing of standard-addition synchronous fluorescence-pH data. Application to the analysis of salicylic acid and its major metabolite in human urine, *Talanta* 122 (2014) 1-7.

- [21] M.A. Crawford, I.L. Hansen, A. Lopez, The excretion of 3-hydroxyanthranilic and quinolinic acid in Uganda Africans, *Br. J. Cancer* 23 (1969) 644-654.
- [22] M.E.P.B. Siqueira, M.J.N. Paiva, Hippuric acid in urine: reference values, *Rev. Saúde Pública* 36 (2002) 723-727.
- [23] D. Strohm, A. Bechthold, N. Isik, E. Leschik-Bonnet, H. Hesecker, Revised reference values for the intake of thiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2) and niacin, *NFS J.* 3 (2016) 20-24.
- [24] T. Ishizaki, T. Sasaki, T. Suganuma, Y. Horai, K. Chiba, M. Watanabe, W. Asuke, H. Hoshi, Pharmacokinetics of ketoprofen following single oral, intramuscular and rectal doses and after repeated oral administration, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 18 (1980) 407-414.

# CAPÍTULO 5.

Membranas de quitosano

---



## SUMMARY

In this section, a chitosan membrane composed by 60% (w/w) of chitosan and 40% (w/w) of Aliquat®336 is proposed as new biopolymeric support for electromembrane extraction.

The synthesis of the membrane was optimized in terms of composition and thickness and the new support was characterized by scan electronic microscopy (SEM).

The support was used in the simultaneous electromembrane extraction of different pharmacological compounds as non steroidal anti-inflammatory drugs (salicylic acid (SAL), ketoprofen (KTP), naproxen (NAX) and ibuprofen (IBU)) as well as polar acidic drugs (nicotinic acid (NIC), amoxicillin (AMX), hippuric acid (HIP) and anthranilic acid (ANT)).

Extraction parameters as organic solvent, pH of donor and acceptor solutions, voltage and extraction time were investigated in order to set the optimal conditions. Once optimization was carried out, the target analytes were successfully extracted performing the EME procedure at 100 V for 10 minutes with chitosan membranes (60% (w/w) of chitosan and 40% (w/w) of Aliquat®336) of 30-35  $\mu\text{m}$  as support of 1-octanol liquid membrane. High enrichment factors were obtained for most of the compounds, with ranges between 118 and 113 for HIP, NIC and SAL, and ranges between 49-20 for ANT, AMX, KTP, NAX and IBU.

Moreover, the target analytes were satisfactorily extracted from human urine samples, providing high extraction efficiency.

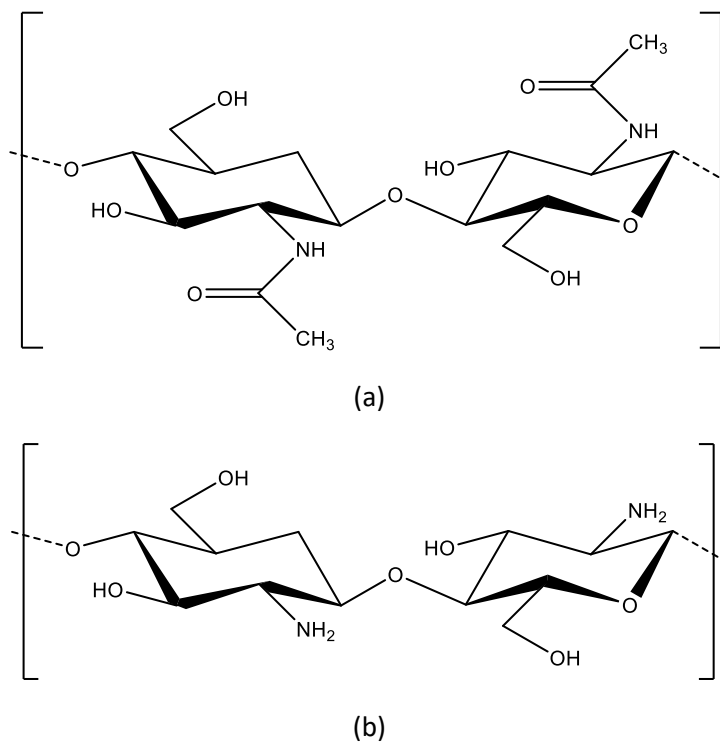


## 5.1. DESCRIPCIÓN DEL SOPORTE

El quitosano es un polisacárido derivado de la quitina que se obtiene de fuentes naturales, principalmente de organismos acuáticos con esqueletos duros como cangrejos, camarones o langostas. Asimismo, algunos microorganismos como los hongos pueden emplearse también como fuente natural de este biopolímero.

Puede obtenerse además mediante un proceso de desacetilación de la quitina, pues la diferencia química entre ambas estructuras radica en las unidades de glucosa que los constituyen. Así, el quitosano está formado por unidades de D-glucosamina y la quitina por unidades de N-acetil-D-glucosamina [1], tal como se puede observar en la Figura 5.1. El proceso de desacetilación puede realizarse por medio de reacciones químicas, esto es, con el uso de disoluciones alcalinas, o mediante métodos enzimáticos, de manera que el grado de desacetilación del quitosano resultante se encuentra entre el 70% y el 95% [2-4]. La actividad biológica del quitosano, así como muchas de sus propiedades físicas y químicas, dependen de su grado de desacetilación [5].

El quitosano es un biopolímero pseudoplástico higroscópico y, debido a la presencia de grupos hidroxilo y amino (-OH y -NH<sub>2</sub>) en su cadena polimérica, puede formar enlaces de hidrógeno fácilmente. Es soluble en ácidos inorgánicos (pH<6) y en varios ácidos orgánicos, siendo el medio de disolución habitual ácido acético al 1% v/v (pH 4). En cambio, es insoluble en agua y en medios alcalinos, pues el grupo amino no puede protonarse en medios neutros y básicos. El peso molecular, el grado de desacetilación, la temperatura y la concentración, son las variables experimentales que controlan la solubilidad de este biopolímero. La reactividad del quitosano depende en gran medida de los grupos funcionales -NH<sub>2</sub> presentes en su estructura química, así como de la disponibilidad de estos grupos para protonarse [1].



**Figura 5.1.** Estructura química de la quitina (a) y del quitosano (b).

Se han descrito, además, otras propiedades del quitosano, como la biocompatibilidad, capacidad de quelación, actividad antimicrobiana o capacidad de gelificación [6-8]. Asimismo, es un material con características interesantes para las estructuras de hidrogel debido a su naturaleza hidrófila y su capacidad de degradación a través de enzimas humanas. En este sentido, se han estudiado hidrogeles basados en quitosano para ingeniería de tejidos y aplicaciones farmacéuticas [9]. Todo ello, junto con la ventaja que supone su elevada permeabilidad al agua y su capacidad de inmovilizar microorganismos, han contribuido a que desde principios del año 2000 se hayan comercializado membranas fabricadas a base de quitosano [10]. No existen, hasta la fecha, referencias al uso del quitosano como membrana en sistemas de extracción o microextracción, por lo que, en esta memoria, se explora su posible uso como soporte de membranas líquidas en sistema de extracción por electromembrana.

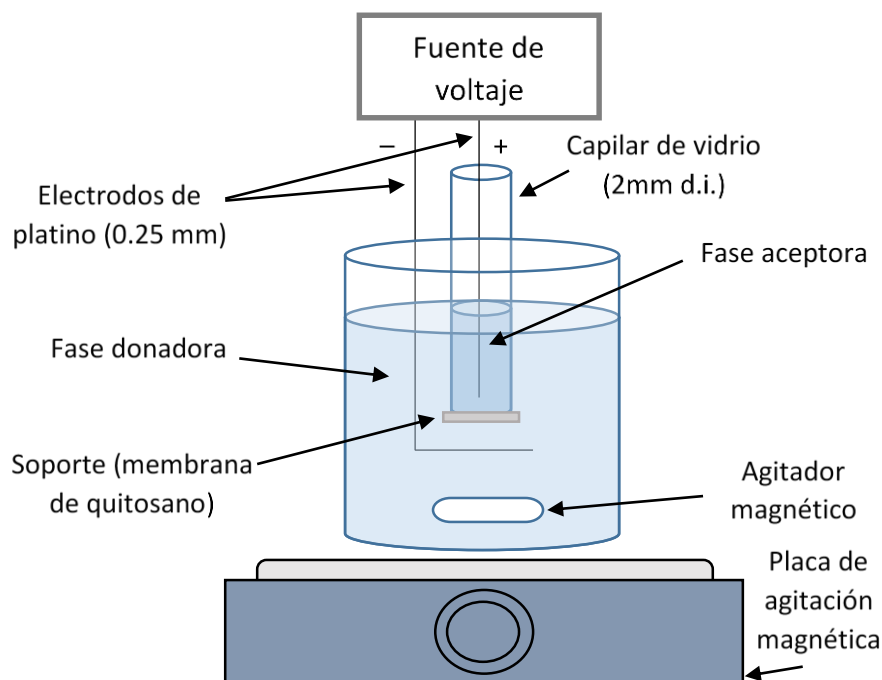


## 5.2. SÍNTESIS

La síntesis de las membranas de quitosano se lleva a cabo disolviendo, poco a poco y con agitación constante, 100 mg de quitosano en 25 ml de ácido acético al 1% (v/v), lo que da lugar a una disolución con un valor de pH aproximadamente igual a 3. Una vez disuelto, se añade gota a gota y con agitación vigorosa una disolución de NaOH 1M hasta alcanzar el pH deseado. Se recomienda un pH inferior a 6.5 ya que a valores de pH superiores la disolución de quitosano comienza a gelificar y, en ese momento, la reacción de gelificación es irreversible. A continuación, se toman 25 mL de la disolución resultante, que se adicionan sobre la cantidad de Aliquat®336 deseada, se agita hasta homogeneidad y se vierten sobre una placa Petri de 90 mm de diámetro. Por último, la placa Petri se introduce en una estufa de vacío a unos 30-35°C hasta la completa eliminación del disolvente, lo que normalmente requiere un par de días. Para su empleo como soporte en procedimientos EME, las membranas requieren un tratamiento adicional, pues se observó que al entrar en contacto con agua, éstas se disolvían completamente, probablemente como consecuencia de residuos de ácido acético remanentes en la membrana. Este problema se solventa sometiendo a la membrana a un procedimiento de lavado. Así, una vez seca, el exceso de ácido acético se elimina lavando dos veces la membrana primero con 10 mL de NaOH 0.1M y, después, con 10 mL de agua durante 30 minutos cada uno. Una vez lavada, la membrana se introduce de nuevo en la estufa de vacío para su secado. Finalmente, la membrana seca se separa fácilmente de la placa.

## 5.3. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

El procedimiento de extracción con este tipo de soporte se llevó a cabo empleando el mismo dispositivo experimental que para los films nanometálicos, cuyo esquema se representa en la Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Dispositivo experimental empleado en el procedimiento EME con membranas de quitosano.

Para ello, la membrana de quitosano se cortó en trozos de 5 mm x 5 mm aproximadamente y se pegó empleando resina epoxi (Araldit Standard Ceys® Barcelona, España) sobre uno de los extremos del capilar de vidrio. Seguidamente, la membrana se impregnó con 5  $\mu$ l del disolvente orgánico empleado como SLM, eliminando el exceso con papel. A continuación, por el otro extremo del capilar, se introdujeron 50  $\mu$ l de fase aceptora con ayuda de una microjeringa, así como un electrodo de platino y, por último, todo ello, se colocó en el interior de un vial de 10 mL conteniendo tanto la fase donadora, como el otro electrodo de platino. Asimismo, con idea de registrar la intensidad de corriente generada durante el proceso de extracción, se colocó en serie un multímetro digital (3430 4  $\frac{1}{2}$ -digit PeakTech®, Ahrensburg, Alemania). Una vez llevada a cabo la extracción, se recogió la fase aceptora con una microjeringa y se inyectaron 20  $\mu$ L en el sistema cromatográfico.

En este caso, el procedimiento EME se aplicó a la determinación simultánea de cuatro AINEs (SAL, KTP, NAX e IBU) y cuatro compuestos ácidos de elevada polaridad (NIC, AMX, HIP y ANT), al igual que con las membranas de inclusión polimérica (PIMs). Las condiciones de separación y determinación cromatográficas de estos compuestos se describen en la sección 4.4. Se estudió la influencia del disolvente orgánico empleado como SLM, el pH de las fases aceptora y donadora, el voltaje de extracción, el pH de la membrana, la proporción de Aliquat®336 y el tipo de quitosano empleado.

## **5.4. RESULTADOS**

### **5.4.1. Optimización de la composición y del espesor de la membrana**

A fin de sintetizar membranas de quitosano óptimas para su uso como soporte en procedimientos EME, se llevaron a cabo una serie de ensayos previos en los que se implementaron factores como el tipo de quitosano empleado (diferentes pesos moleculares), el espesor de la membrana y la cantidad de Aliquat®336 presente en la misma, de manera análoga a como se procedió con los PIMs.

Así, en primer lugar, se probaron quitosanos de tres pesos moleculares diferentes: 110000-150000 Da, 140000-220000 Da y 310000-375000 Da. Aunque no se apreciaron diferencias significativas cuando se emplearon cada una de las membranas anteriores en el procedimiento EME, se observó que las membranas constituidas por el quitosano de mayor peso molecular eran las más homogéneas al ser visualizadas microscópicamente, así como las que proporcionaban resultados más reproducibles en el procedimiento de extracción. Por tanto, para la optimización del procedimiento de extracción se decidió emplear membranas sintetizadas a partir de un quitosano de alto peso molecular (310000-375000 Da).

Por otra parte, como ya se indicó anteriormente, el quitosano es un biopolímero con grupos amino ionizables en su estructura química. Se

considera una base débil con un  $pK_a$  comprendido entre 6.1 y 6.5, en función del grado de N-desacetilación [11, 12]. Por este motivo, el pH de la disolución de quitosano podría tener una gran influencia en el proceso de extracción de los analitos estudiados. De hecho, a valores de  $pH > 6.5$  las disoluciones de quitosano se vuelven hidrogeles, lo que constituye un proceso irreversible. Por otro lado, el pH de la disolución de quitosano en ácido acético al 1% (v/v) tiene un valor aproximado de pH 3-4. Así, se prepararon diferentes disoluciones de quitosano de alto peso molecular ajustando el pH de las mismas con NaOH 1M hasta valores de 4, 4.5, 5, 5.7 y 6.4, lavando posteriormente la membrana según el procedimiento descrito en la sección 5.2. Una vez llevado a cabo el procedimiento de extracción con cada una de las membranas anteriores, los factores de enriquecimiento obtenidos para los analitos estudiados presentaban pequeñas diferencias, observándose valores ligeramente superiores con las membranas de pH 5, razón por la que se consideró éste como pH óptimo para la síntesis de la membrana.

Por otra parte, se probaron también diferentes cantidades de Aliquat®336 en la membrana a fin de obtener diferentes proporciones de quitosano-Aliquat®336, siendo éstas de 90:10, 60:40 and 30:70% (p/p). Se observó que la cantidad de Aliquat®336 presente en la membrana influía únicamente en las propiedades físicas de la misma, obteniéndose membranas de diferente flexibilidad. Así, la ausencia de Aliquat®336 en la membrana, impedía que ésta se despegara de la placa Petri para su manipulación. Sin embargo, la proporción de Aliquat®336 no afectaba a la eficacia del proceso de extracción, pues en cualquier caso se obtenían resultados similares. Por tanto, en este caso, se deduce que el papel del Aliquat®336 es única y exclusivamente como plastificante y no como carrier.

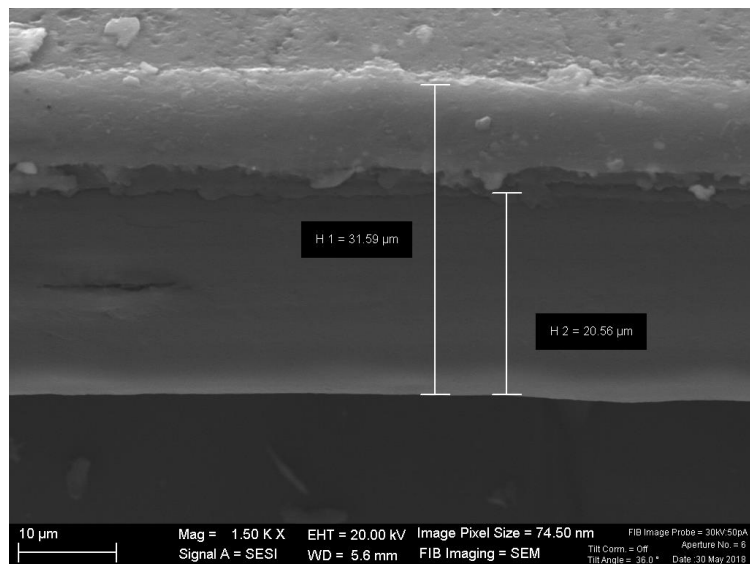
Por otro lado, teniendo en cuenta el tratamiento de lavado con NaOH 0.1M que requiere la membrana previo a su empleo en EME, podría ocurrir que se produjeran algunas pérdidas del Aliquat®336 presente en la membrana durante dicho tratamiento. Asimismo, el Aliquat®336 es un

carrier catiónico que podría tener un papel activo en el procedimiento de extracción, por lo que, a fin de comprobar esto, se llevaron a cabo ensayos adicionales empleando como SLM mezclas al 5 y 10% (p/v) de Aliquat®336/1-octanol, respectivamente. Los resultados obtenidos indicaron que los factores de enriquecimiento no mejoraban con la presencia de Aliquat®336 en la SLM, lo que refuerza el hecho de que la extracción de los analitos estudiados no está mediada por carriers, sino que el papel del Aliquat®336 es únicamente el de plastificante.

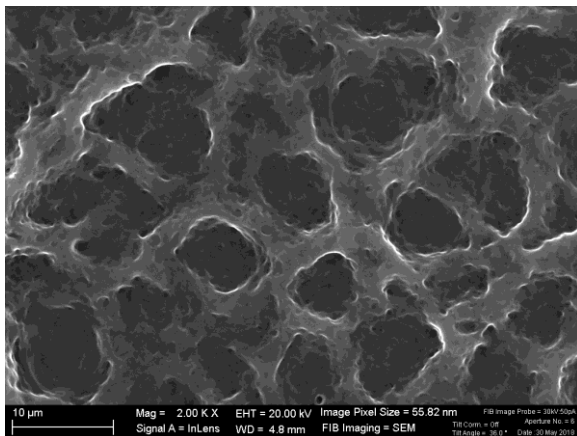
Para analizar la influencia del espesor de la membrana, se vertieron volúmenes de 5, 10, 15 y 25 mL de la mezcla quitosano/Aliquat®336 sobre una placa Petri de vidrio de 90 mm de diámetro. Se observó que un volumen de 5 mL resultaba insuficiente para la formación de una membrana que pudiera manipularse. Las membranas obtenidas con un volumen de 10 mL resultaban aún muy finas, lo que dificultaba su posterior manipulación. En el caso de las membranas obtenidas con 15 mL de mezcla, las que contenían una pequeña proporción de Aliquat®336 (10% (p/p)) eran muy frágiles, por lo que se rompían al ser manipuladas. En cambio, para ese mismo volumen de mezcla y un mayor contenido de Aliquat®336 (40 y 70% (p/p)), las membranas resultaban aptas para su manipulación. En el caso de membranas obtenidas a partir de un volumen de disolución de 25 mL, todas ellas, independientemente de la cantidad de Aliquat®336 añadida, presentaban buena consistencia y resistencia para su empleo en el procedimiento de extracción.

A fin de caracterizar las membranas sintetizadas a partir de 15 y 25 mL de mezcla, en términos de espesor y homogeneidad, se recurrió a la microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, se empleó un microscopio electrónico de barrido Zeiss Auriga (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania). Se observaron espesores de 25-30  $\mu\text{m}$  para las membranas obtenidas a partir de 15 mL de síntesis, mientras que aquellas obtenidas con 25 mL presentaban un espesor de 30-35  $\mu\text{m}$ , tal como puede observarse en la Figura 5.3a. Asimismo, en la Figura 5.3b puede observarse

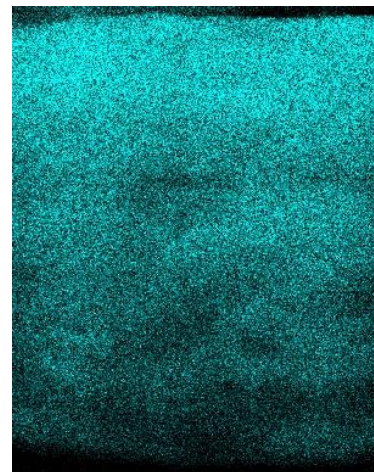
la imagen microscópica de la homogeneidad en el tamaño de poro de la membrana de quitosano de mayor espesor. En la Figura 5.3c se observa también una distribución homogénea de los átomos de carbono en la membrana de quitosano.



(a)



(b)



(c)

**Figura 5.3.** Imágenes SEM de la membrana de quitosano de 30-35  $\mu\text{m}$  (25 mL de síntesis vertidos en una placa Petri de 90 mm de diámetro). (a) Medida del espesor; (b) distribución homogénea en la estructura de la membrana de quitosano; (c) distribución homogénea de los átomos de C en la membrana de quitosano.

Una vez realizados los estudios preliminares, los resultados obtenidos con cada una de las membranas sintetizadas, en términos de factores de enriquecimiento, revelaron que la composición óptima de la membrana que proporcionaba los factores de enriquecimiento más altos implicaban una proporción de quitosano/Aliquat®336 del 60:40% (p/p). Asimismo, se observó que el peso molecular del quitosano no afectaba a la eficacia de la extracción sino a la homogeneidad de la membrana, por lo que las membranas seleccionadas para llevar a cabo la optimización posterior del procedimiento EME fueron aquellas obtenidas a partir de quitosano de alto peso molecular, de 30-35 µm de espesor y con un contenido de 60:40% (p/p) de quitosano/Aliquat®336.

#### **5.4.2. Disolvente orgánico empleado como SLM**

Se emplearon tres disolventes orgánicos diferentes como membrana líquida con objeto de encontrar el más adecuado para el procedimiento de extracción con este tipo de soportes, siendo estos 1-octanol, dihexiléter (DHE), nitrofeniloctil éter (NPOE) y mezclas 1:1 de los anteriores, seleccionados en función de los resultados observados en experiencias anteriores con cada uno de ellos. El dihexiléter proporcionaba los factores de enriquecimiento más bajos para todos los compuestos, con valores que iban desde 10 para el NAX hasta 60 para el NIC. La adición de NPOE mejoraba ligeramente los enriquecimientos (un 10% aproximadamente) cuando se usaba en mezclas 1:1 con DHE y 1-octanol. Por su parte, se comprobó que el uso de NPOE puro no resultaba adecuado para la extracción de los analitos seleccionados, siendo más apropiado para la extracción de analitos básicos. En cambio, cuando se empleaba 1-octanol puro como SLM, los analitos poco extraídos con los disolventes anteriores, mejoraban considerablemente sus factores de enriquecimiento (aproximadamente un 50% más).

### 5.4.3. Influencia del pH de las fases donadora y aceptora y del voltaje de extracción

Como se ha indicado anteriormente, el pH de las fases aceptora y donadora es una variable de gran importancia en la eficacia de los procedimientos EME, cuyo valor puede verse modificado durante el proceso de extracción como consecuencia de la existencia de electrolisis, afectando por tanto al rendimiento de extracción [13-15].

Así, se estudió la influencia del pH de la fase aceptora a 4 valores de pH: 5, 6, 10 y 12. El primer valor (pH 5) constituye el pH del agua desionizada. El resto de pHs se ajustaron empleando un tampón acético/acetato 100mM para pH 6, amoníaco/cloruro amónico 100mM para pH 10 y NaOH 10mM para pH 12. Para analizar la influencia del pH de la fase aceptora se llevaron a cabo extracciones de 10 min con voltajes variables en el rango de 0 a 50 V, observándose dos aspectos importantes. En primer lugar, se observó que el pH de la fase aceptora no variaba de manera sustancial durante el proceso de extracción. Por otra parte, se obtenían factores de enriquecimiento más elevados al aumentar el voltaje aplicado. En la Figura 5.4, se muestran los factores de enriquecimiento obtenidos para cada analito cuando se aplica un voltaje de 50V.

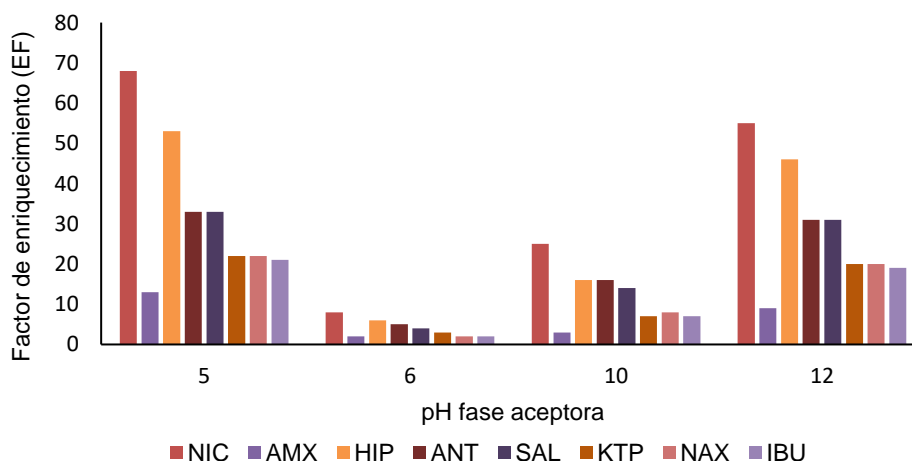


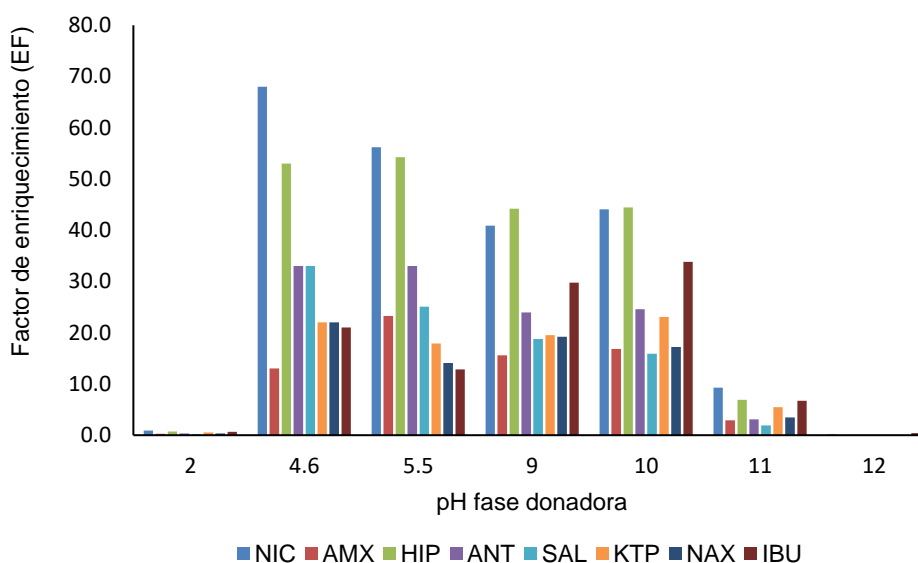
Figura 5.4. Influencia del pH de la fase aceptora a 50V.



Para valores por debajo de pH 5 de la fase aceptora, los analitos prácticamente no se extraían, dada la naturaleza ácida de los mismos.

Por otra parte, como puede observarse en la Figura 5.4, cuando se emplea una fase aceptora a pH 5 (correspondiente al agua desionizada), se obtiene, en general, una mayor eficacia de extracción para todos los compuestos estudiados.

Por otro lado, también se analizó la influencia del pH de la fase donadora. Para ello, se ajustó el pH de la fase donadora en el rango comprendido entre 2 y 12, siendo pH 4.6 el valor de pH correspondiente a una disolución acuosa de los analitos estudiados de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de concentración. Los resultados obtenidos, en términos de factores de enriquecimiento, se representan en la Figura 5.5.

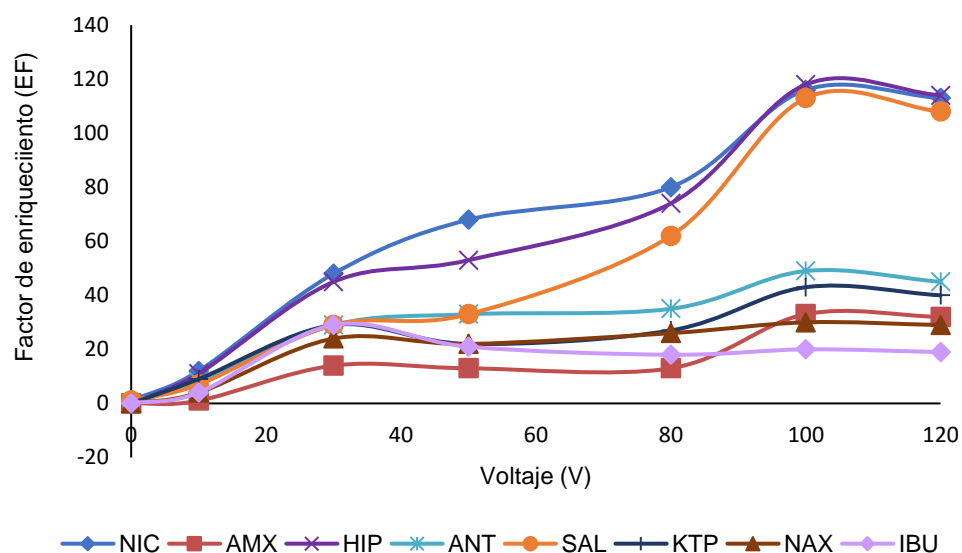


**Figura 5.5.** Influencia del pH de la fase donadora a 50V.

Como puede observarse, para la mayoría de los AINEs, los factores de enriquecimiento más elevados se obtienen a pH 4.6 (resultante de la disolución acuosa de los analitos), disminuyendo éstos al aumentar el pH, a excepción del IBU y el KTP cuyos enriquecimientos son ligeramente superior a pH 10. Para un pH 2 y pH 12, se obtienen enriquecimientos muy pobres

para todos ellos. Por su parte, la extracción de los compuestos polares disminuye, en general, al aumentar el pH por encima de 4.6, a excepción de la AMX. Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados, se estableció un valor de 4.6 como pH óptimo de la fase donadora, como un compromiso entre los factores de enriquecimiento de los diferentes analitos estudiados.

Por último, para comprobar la influencia del voltaje en el proceso de extracción se aplicaron voltajes comprendidos entre 10 y 120 V. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 5.6.



**Figura 5.6.** Influencia del voltaje aplicado en la eficacia del procedimiento de extracción.

Como puede observarse, la extracción aumenta considerablemente para todos los compuestos al aumentar el voltaje de 20 a 30V. En el caso del NIC e HIP los factores de enriquecimiento aumentan al aumentar el voltaje hasta 100V. Lo mismo ocurre para el SAL, aunque en este caso el incremento más notable se produce al aumentar de 50 a 80V. En el caso de ANT, KTP y NAX se observa una mejora de los factores de enriquecimiento mucho más moderada al aumentar el voltaje. La extracción del IBU, en cambio, mejora al aumentar de 10 a 30V, disminuyendo posteriormente hasta 50V, por encima del cual los valores para este compuesto permanecen

prácticamente constantes. La AMX, por su parte, mejora su extracción de forma más pronunciada de 80 a 100V, por lo que, se seleccionó un valor de 100V como voltaje óptimo de extracción para todos los analitos.

#### **5.4.4. Influencia del tiempo de extracción**

El tiempo de extracción fue otra variable analizada. Así, se llevaron a cabo extracciones durante 5, 7, 10, 15 y 20 minutos, aplicando en todos los casos las condiciones de extracción óptimas anteriormente establecidas. Se observó que la eficacia de extracción óptima, en términos de factores de enriquecimiento, se obtenía para extracciones de 10 min, por encima de los cuales los valores se mantenían prácticamente constantes.

#### **5.4.5. Validación**

Una vez optimizadas todas las variables experimentales, el procedimiento de extracción de los compuestos estudiados consiste en aplicar un potencial de 100 V durante 10 minutos, con agitación constante de 10 mL de fase donadora (disolución acuosa conteniendo los analitos seleccionados, pH 4.6) a 600 rpm. Para la fase aceptora se emplearon 50  $\mu$ L de agua ultrapura (pH 5). La intensidad de corriente media registrada en estas condiciones fue de 95-460  $\mu$ A y los factores de enriquecimiento obtenidos para los compuestos estudiados fueron 116 para NIC, 33 para AMX, 118 para HIP, 49 para ANT, 113 para SAL, 43 para KTP, 30 para NAX y 20 para IBU. Se puede establecer, por tanto, que las membranas de quitosano constituyen también un eficiente soporte para la extracción simultánea de AINEs y compuestos de elevada polaridad.

Se llevó a cabo la validación analítica del método, calculando para ello parámetros tales como linealidad, sensibilidad y precisión. En la Tabla 5.1 se muestran los datos de calibración del método cromatográfico, incluyendo rango lineal, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), así como los factores de enriquecimiento obtenidos para todos los compuestos en las condiciones óptimas.

**Tabla 5.1.** Datos de calibración, límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y factores de enriquecimiento (EF) de los analitos estudiados.

Analito	Rango lineal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Linealidad		LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	EF
		(%)	( $R^2$ )			
NIC	7-100	98.9	0.9987	2.0	7.0	116
AMX	9-20	94.0	0.9964	3.0	9.0	33
	21-80	96.7	0.9989	6.0	21.0	
HIP	8-90	98.3	0.9978	2.0	8.0	118
ANT	14-100	97.0	0.9956	4.0	14.0	49
SAL	6-20	95.8	0.9965	2.0	6.0	113
KTP	3-25	98.2	0.9993	1.0	3.0	43
NAX	15-100	97.3	0.9978	5.0	15.0	30
IBU	22-100	97.1	0.9975	7.0	22.0	20

Para el cálculo de LOD y LOQ se empleó el mismo criterio que en los casos anteriores (3 y 10 veces la relación señal ruido, respectivamente) [16]. Puede observarse buena linealidad en todos los casos, con valores entre el 94.0% para la AMX y el 98.9% para el NIC. Los límites de detección están comprendidos entre  $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para el KTP y  $7.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para IBU, mientras que los de cuantificación se encuentran entre  $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para el KTP y  $22.0 \mu\text{g L}^{-1}$  para IBU. Hay que indicar que en el caso de la AMX se obtuvieron dos rangos lineales correspondientes a diferentes niveles de concentración, siendo de 9 a  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  el rango lineal a bajas concentraciones y de 21 a  $80 \mu\text{g L}^{-1}$  el rango lineal a concentraciones mayores.

Asimismo, se determinaron la repetibilidad y la precisión intermedia a partir de medidas realizadas en un solo día y durante tres días de manera

semanal, aplicando el procedimiento EME propuesto a muestras de orina humana. Así, se obtuvieron %RSD entre 1-11% para la repetibilidad y entre 5-14% para la precisión intermedia.

#### 5.4.6. Aplicación a muestras reales

Para comprobar la idoneidad del procedimiento EME propuesto para su aplicación a muestras reales, se emplearon muestras de orina humana que fueron dopadas a tres niveles de concentración (de acuerdo a los rangos lineales correspondientes) con los analitos estudiados, diluidas con agua ultrapura (1:1000 v/v) y sometidas al procedimiento EME/HPLC-DAD. Las recuperaciones obtenidas se muestran en la Tabla 5.2. Como puede observarse, se obtienen recuperaciones adecuadas para todos los analitos a los diferentes niveles de concentración ensayados.

**Tabla 5.2.** Recuperaciones (%) de los analitos estudiados en muestras de orina humana sometidas al procedimiento EME/HPLC-DAD propuesto.

Analito <sup>a</sup>	Concentración de la orina dopada (mg L <sup>-1</sup> )		
	10 <sup>b,c</sup>	25 <sup>d,e</sup>	50 <sup>f</sup>
NIC	80.0	96.1	97.3
AMX	91.2	89.7	95.3
HIP	86.9	103.5	94.6
ANT	85.1	103.2	92.7
SAL	92.4	99.9	—
KTP	93.1	89.8	90.9
NAX	99.1	89.9	80.2
IBU	—	92.8	98.3

<sup>a</sup>Media de tres determinaciones (RSD < 6%)

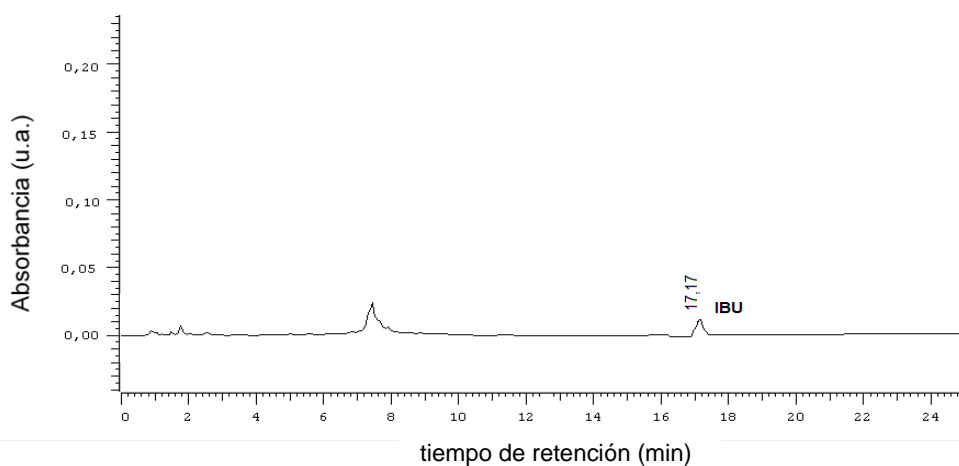
<sup>b</sup>15 mg L<sup>-1</sup> para ANT y NAX; <sup>c</sup>5 mg L<sup>-1</sup> para KTP; <sup>d</sup>20 mg L<sup>-1</sup> para SAL; <sup>e</sup>10 mg L<sup>-1</sup> para KTP; <sup>f</sup>20 mg L<sup>-1</sup> para KTP.

Adicionalmente, también se analizaron muestras de orina de voluntarios sometidos a la ingesta de una única dosis de ácido acetilsalicílico (ASA, 500 mg) o ibuprofeno (600 mg), que se diluyeron con agua ultrapura (1:1000 v/v) y se sometieron al procedimiento EME/HPLC-DAD.

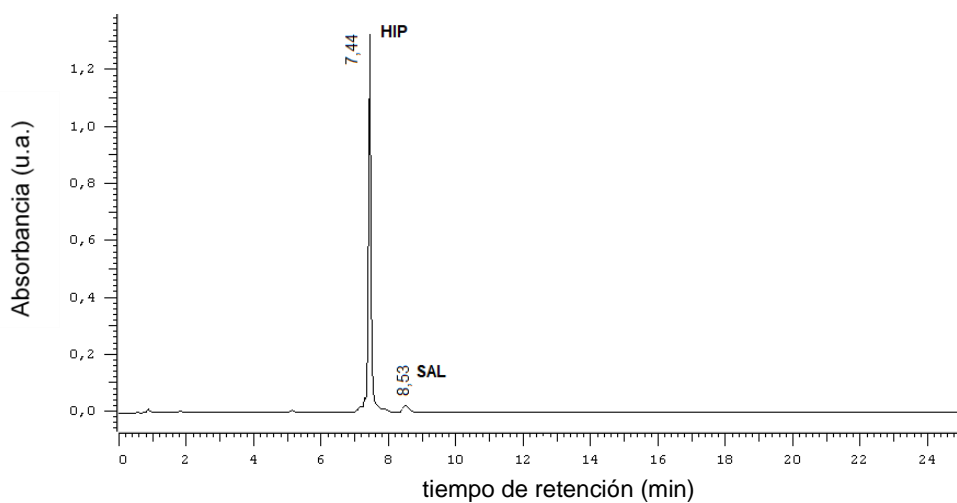
La dosis habitual de IBU está entre los 400 y los 800 mg tres veces al día. Su eliminación es completa 24 horas después de su ingesta, siendo, aproximadamente, el 10% excretada en la orina a las 6 u 8 horas. El 90% del IBU excretado está en forma de sus metabolitos, principalmente como compuestos hidroxilados y carboxilados y sus conjugados [17, 18].

En el caso del SAL, éste se genera por hidrólisis del ácido acetilsalicílico (ASA). El ASA es el principio activo de la aspirina, fármaco de consumo habitual con propiedades antipiréticas y analgésicas [19], que se excreta en un 100% como SAL entre las 2 y 4 horas después de la ingesta. Se han encontrado niveles de SAL en orina del orden de centenares de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  [20].

Por su parte, el HIP, como ya se indicó anteriormente, es uno de los principales metabolitos endógenos presentes en la orina humana, cuya concentración en la orina puede ser muy elevada debido a diabetes infantil, una posible intoxicación por tolueno o fallos renales [21-23]. Asimismo, se ha encontrado que los niveles de HIP en la orina pueden verse incrementados debido al consumo de aspirina, así como por una dieta rica en frutas y verduras [24]. En la Figura 5.7, se muestran los cromatogramas de las muestras analizadas.



(a)



(b)

**Figura 5.7.** Cromatogramas de las muestras de orina sometidas al procedimiento EME propuesto. (a) muestra de orina recogida 7 horas después de la ingesta de 600 mg de IBU; (b) muestra de orina recogida 4 horas después de la ingesta de 500 mg de ASA.

Como puede verse, en el caso de la orina procedente del voluntario que ingirió el comprimido de aspirina, además del pico cromatográfico correspondiente al SAL, se observa también un intenso pico que podría deberse a la presencia de HIP en la orina. A fin de comprobar los niveles de SAL, HIP e IBU encontrados, estos compuestos se añadieron, a dos niveles de concentración, a las muestras de orina originales y se sometieron al procedimiento de extracción propuesto, obteniéndose los resultados indicados en la Tabla 5.3.

En primer lugar, hay que destacar las buenas recuperaciones de las muestras de orina dopadas, lo que confirma la idoneidad del método propuesto.

En la orina correspondiente al voluntario que ingirió el comprimido de aspirina, el nivel de SAL encontrado fue de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Este valor resulta inferior al esperado a tenor de los datos bibliográficos, lo que podría deberse a una incompleta metabolización del ASA, dado que la orina se recogió 2 horas después de la ingesta de dicho fármaco.

**Tabla 5.3.** Aplicación del procedimiento EME propuesto a muestras de orina humana.

<b>Analito</b>	<b>Dosis ingerida (mg)</b>	<b>Tiempo de excreción (h)</b>	<b>Nivel dopado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentración encontrada en la orina<sup>a</sup> (mg L<sup>-1</sup>)</b>
IBU	600	7	0	289
			25	310
			50	336
SAL	500 <sup>b</sup>	2	0	20.1
			5	24.8
			10	29.6
HIP	0	2	0	1048
			100	1140
			200	1237

<sup>a</sup>Media de tres determinaciones (RSD < 6%).

<sup>b</sup>Como ácido acetilsalicílico.

Asimismo, se confirma la presencia de HIP en esta misma orina. El voluntario al cual pertenece esta muestra de orina no había sido expuesto a tolueno, ni tenía diabetes ni ninguna otra posible enfermedad que causara estos elevados niveles de HIP en la orina (1048 mg L<sup>-1</sup>). Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, los niveles de este metabolito endógeno en la orina pueden verse notablemente incrementados en personas con una dieta rica en frutas y verduras, así como por el consumo de aspirina, hechos que coinciden en este caso, lo que justificaría los niveles de HIP encontrados.

Por otro lado, la orina obtenida después de la ingesta de IBU muestra una concentración de este fármaco que está en concordancia con la cantidad esperada, así como un pico de escasa importancia que podría ser ácido hipúrico endógeno.

Los resultados obtenidos indican, por tanto, que este tipo de membranas de quitosano, sintetizadas a medida, constituyen una alternativa viable como soportes de la membrana líquida en la extracción por



electromembrana de AINEs y otros compuestos ácidos de elevada polaridad.

## REFERENCIAS

- [1] S. Ahmed, S. Ikram, (Eds) (2017) Chitosan. Derivatives, composites and applications, John Wiley & Sons, Dehli, India.
- [2] M. Rinaudo, Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials, *Polym. Int.* 57 (2008) 397-430.
- [3] M. Rinaudo, Physical properties of chitosan and derivatives in sol and gel states. In: B. Sarmento, J. das Neves, (Eds) (2012) Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- [4] I. Younes, S. Hajji, V. Frachet, M. Rinaudo, K. Jellouli, M. Nasri, Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan, *Int J Biol Macromol.* 69 (2014) 489-98.
- [5] I. Younes, M. Rinaudo, Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, *Mar Drugs* 13 (2015) 1133-74.
- [6] S. Thomas, N. Ninan, S. Mohan, E. Francis, (Eds) (2013) Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends and IPNs. Apple Academic Press, Toronto, Canada.
- [7] J. Ma, Y. Sahai, Chitosan biopolymer for fuel cell applications, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 955-75.
- [8] S. Ahmed, M. Ahmad, S. Ikram, Chitosan: A natural antimicrobial agent- A review, *J. Applicable Chem.* 3 (2014) 493-503.

- [9] F. Ahmadi, Z. Oveisi, S. Mohammadi-Samani, Z. Amoozgar, Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications, *Res. Pharm. Sci.* 10 (2015) 1-16.
- [10] C. Clasen, T. Wilhelms, W.M. Kulicke, Formation and Characterization of Chitosan Membranes, *Biomacromolecules* 7 (2006) 3210–3222.
- [11] F. Ahmadi, Z. Oveisi, S. Mohammadi-Samani, Z. Amoozgar, Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications, *Res. Pharm. Sci.* 10 (2015) 1-16.
- [12] J.W. Park, K.H. Choi, Acid-Base Equilibria and Related Properties of Chitosan, *Bull. Korean Chem. Soc.* 4 (1983) 68-72.
- [13] A. Slampová, P. Kubán, P. Bocek, Quantitative aspects of electrolysis in electromembrane extractions of acidic and basic analytes, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015) 92-100.
- [14] A. Slampová, P. Kubán, P. Bocek, Additional considerations on electrolysis in electromembrane extraction, *J. Chromatogr. A.* 1429 (2016) 364-368.
- [15] P. Kubán, P. Bocek, The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extraction: The role of acceptor solution, *J. Chromatogr. A.* 1398 (2015) 11-19.
- [16] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4<sup>th</sup> ed., Prentice Hall, London, 2000.
- [17] E.J. Antal, C.E. Wright, B.L. Brown, K.S. Albert, L.C. Aman, N.W. Levin, The influence of hemodialysis on the pharmacokinetics of ibuprofen and its major metabolites, *J. Clin. Pharmacol.* 26 (1986) 184-190.
- [18] B.G. Katzung, D.E. Furst, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics, drugs used in gout, in: *Basic and clinical pharmacology*, 7th Ed., Appliton and Lang Stamford, Connecticut, 1998.

- [19] B.E. Cham, J.H.M. Dykman, F. Bochner, Urinary excretion of aspirin, *Br. J. Clin. Pharmac.* 14 (1982) 562-564.
- [20] A.P. Pagani, G.A. Ibañez, Second-order multivariate models for the processing of standard-addition synchronous fluorescence–pH data. Application to the analysis of salicylic acid and its major metabolite in human urine, *Talanta* 122 (2014) 1-7.
- [21] M.S. Goligorsky, Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney disease: a retrospective and what the future may hold, *Kidney Res. Clin. Pract.* 34 (2015) 76-82.
- [22] S. Decharat, Hippuric Acid levels in paint workers at steel furniture manufacturers in Thailand, *Saf. Health Work* 5 (2014) 227-233.
- [23] M. An, Y. Gao, Urinary biomarkers of brain diseases, *Genom. Proteom. Bioinforma.* 13 (2015) 345-354.
- [24] O. Agüero-Sánchez, H. Díaz-Padrón, T. Guevara-Andreu, E. Cisneros-Prego, I. Sánchez-Jacas, Valores de ácido hipúrico en orina en trabajadores expuestos a tolueno, *Rev. Cubana de Salud y Trabajo* 11 (2010) 45-50.



## CONCLUSIONES

---



Del estudio realizado, que se resume en esta Memoria, cabe destacar los aspectos que se recogen en las siguientes conclusiones:

1. Se han desarrollado nuevos materiales para su uso como soportes activos de la membrana líquida en procedimientos de extracción por electromembrana, constituyendo alternativas viables a los soportes de polipropileno tradicionalmente usados.

2. Se han sintetizado, caracterizado y propuesto por primera vez películas de agar de 20  $\mu\text{m}$  de espesor que contienen nanopartículas de plata de 20-30 nm de diámetro como soporte para la extracción por electromembrana de cinco fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): ácido salicílico, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno. Se han optimizado el espesor y la cantidad de plata de la membrana, así como las condiciones de extracción, proporcionando una eficiencia de extracción de 10 a 70 veces mayor en comparación con otros soportes de polipropileno tradicionales (como fibras huecas y membranas planas). Cabe destacar que la síntesis de las membranas nanometálicas propuestas es un procedimiento fácil y ajustable que permite la selección del espesor de la película y las características de las nanopartículas para mejorar la eficiencia de extracción. Además, el dispositivo propuesto puede reutilizarse al menos tres veces, minimizando el tiempo y el coste del análisis.

3. Se ha desarrollado y optimizado un procedimiento de extracción por electromembrana mediado por transportadores para la determinación de cuatro compuestos ácidos de elevada polaridad (ácido nicotínico, amoxicilina, ácido hipúrico y ácido salicílico) utilizando membranas de nanofibras Tiss®-OH de 100  $\mu\text{m}$  de espesor fabricadas por electrospinning como nuevo soporte de una membrana líquida constituida por Aliquat®336 al 5% (p/v) en 1-octanol. Se han logrado excelentes resultados con recuperaciones del 60% al 85% para los analitos con extracciones de solo 10 minutos.

4. El método propuesto con Tiss®-OH se ha aplicado con éxito en la determinación de los analitos estudiados en muestras de orina humana de

voluntarios sanos dopadas a tres niveles de concentración. Se ha demostrado también su idoneidad para la determinación de amoxicilina en una muestra de orina humana recogida 7 horas después de la administración oral de este medicamento.

5. Se ha optimizado e implementado por primera vez un procedimiento de extracción por electromembrana para la extracción simultánea de cuatro fármacos antiinflamatorios no esteroideos (ácido salicílico, ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno) y cuatro compuestos ácidos muy polares (ácido antranílico, ácido nicotínico, amoxicilina y ácido hipúrico) utilizando membranas de inclusión de polimérica planas (PIMs) como soporte de 1-octanol como membrana líquida. Se ha optimizado la síntesis de los PIMs a una composición del 29% (p/p) de triacetato de celulosa como polímero base y 71% (p/p) de Aliquat®336 como carrier catiónico y se ha observado que PIMs de 25 µm de espesor proporcionan recuperaciones entre el 81% y el 34%.

6. Se ha demostrado de forma satisfactoria la aplicabilidad del procedimiento EME propuesto con PIMs como soporte para la determinación de los analitos estudiados en muestras de orina humana procedentes de voluntarios sanos tras la administración oral de diferentes dosis de NAX, AMX, ASA e IBU.

7. Se ha desarrollado un nuevo soporte biopolimérico para la membrana líquida compuesto por un 60% (p/p) de quitosano y un 40% (p/p) de Aliquat®336, de 30-35 µm de espesor, para la extracción por electromembrana de compuestos farmacológicos de diferente naturaleza, como compuestos ácidos polares y antiinflamatorios no esteroideos, proporcionando elevados factores de enriquecimiento.

8. Las membranas de quitosano sintetizadas a medida se han utilizado con éxito como soporte en el procedimiento EME propuesto para la determinación de los analitos estudiados en muestras de orina humana. Se ha demostrado que son apropiadas para determinar ácido salicílico e



ibuprofeno en muestras de orina humana de voluntarios sometidos a una dosis única de ASA o IBU, respectivamente.

9. Todos estos materiales pueden considerarse adecuados para su empleo como soportes de la membrana líquida en sistemas de extracción por electromembrana. Se ha demostrado que las películas de agar que contienen AgNPs son apropiadas para la extracción por electromembrana de AINEs, mientras que los Tiss®-OH deben elegirse para la EME de compuestos ácidos de elevada polaridad. Por otro lado, los PIMs y las membranas de quitosano se pueden utilizar para la extracción simultánea de fármacos de diferente naturaleza, proporcionando elevadas recuperaciones o preconcentración.

10. Los nuevos soportes propuestos tienen la posibilidad de ser fabricados “a medida” y funcionalizados mediante diferentes modificaciones estructurales en función de los requerimientos y de la naturaleza de los analitos, mientras que las características de otros soportes tradicionales, como fibras huecas o membranas planas, se limitan a las suministradas comercialmente. Se trata de soportes que podrían hacerse selectivos o incluso específicos para la detección de ciertos analitos mediante el uso de diferentes nanopartículas metálicas o no metálicas, con diferentes formas y tamaños, así como mediante su funcionalización, con el objetivo de favorecer la migración de los compuestos. Asimismo, podrían aplicarse en diferentes modalidades de extracción por electromembrana, como por ejemplo en dispositivos microfluídicos.



The most remarkable conclusions derived from this research are listed below:

1. New materials have been developed to be used as active supports of the liquid membrane in electromembrane extraction procedures, providing viable alternatives to traditionally used polypropylene supports.

2. Agar films of 20  $\mu\text{m}$  thickness containing silver nanoparticles of 20-30 nm diameter have been synthesized, characterized and proposed for the first time as support for electromembrane extraction of five non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): salicylic acid, ketoprofen, naproxen, diclofenac and ibuprofen. Thickness and silver amount of the membrane, as well as the extraction conditions have been optimized, providing 10- to 70-fold higher extraction efficiency compared to other traditional polypropylene supports (as hollow fibers and flat membranes). It is notable that the synthesis of the proposed nanometallic films is an easy and tunable procedure that allows the selection of film thickness and nanoparticle characteristics, in order to improve the extraction efficiency. In addition, the proposed device can be reused for at least three times, minimizing time and cost of analysis.

3. A carrier-mediated electromembrane extraction procedure has been developed and optimized for the determination of four high polarity acidic compounds (nicotinic acid, amoxicillin, hippuric acid and salicylic acid) using a Tiss<sup>®</sup>-OH nanofiber membranes of 100  $\mu\text{m}$  thickness manufactured by electrospinning as new support of a 5% (w/v) Aliquat<sup>®</sup>336 in 1-octanol liquid membrane. Excellent results have been achieved with recoveries in the 60–85% range for the analytes just with 10 minutes extractions.

4. The proposed method with Tiss<sup>®</sup>-OH has been successfully applied to the determination of the target analytes in human urine samples from healthy volunteers spiked at three concentration levels. It has been also proved its suitability for the determination of amoxicillin in a human urine sample collected 7 hours after an oral administration of this drug.

5. An electromembrane extraction procedure has been optimized and implemented for the first time to the simultaneous extraction of four non-steroidal anti-inflammatory drugs (salicylic acid, ketoprofen, naproxen and ibuprofen) and four highly polar acidic drugs (anthranilic acid, nicotinic acid, amoxicillin and hippuric acid) using flat polymer inclusion membranes (PIMs) as support of 1-octanol liquid membrane. Synthesis of PIMs has been optimized to a composition of 29% (w/w) of cellulose triacetate as base polymer and 71% (w/w) of Aliquat®336 as cationic carrier and PIMs of 25 µm thickness have been found to provide recoveries ranging between 81% and 34%.

6. The applicability of the proposed EME procedure with PIMs as support has been satisfactorily demonstrated for the determination of the target analytes in human urine samples collected from healthy volunteers after the administration of different oral doses of NAX, AMX, ASA and IBU.

7. A new biopolymeric support for the liquid membrane composed by 60% (w/w) chitosan and 40% (w/w) Aliquat®336 of 30-35 µm thickness has been developed for the electromembrane extraction of pharmacological compounds of different nature, as polar acidic drugs and non-steroidal anti-inflammatory drugs, providing high enrichment factors.

8. Chitosan tailor-made membranes have been successfully used as support in the proposed EME procedure for the determination of the target analytes in human urine samples. They were found to be appropriate to determine salicylic acid and ibuprofen in human urine samples from volunteers submitted to a single dosage of ASA or IBU, respectively.

9. All these materials could be considered suitable for being used as supports in electromembrane extraction systems. Agar films containing AgNPs have been demonstrated to be appropriate for electromembrane extraction of NSAIDs, whereas Tiss®-OH should be selected for EME of high polarity acidic drugs. On the other hand, PIMs and chitosan membranes could be used for the simultaneous extraction of drugs with different nature, providing high recoveries or preconcentration.

10. These new proposed supports could have the possibility of being self-manufactured and functionalized according to the requirements by different structural modifications on demand of the nature of the target analytes, whereas characteristics of other traditional supports, as hollow fibers or flat membranes, are limited to those provided by commercial suppliers. They could become selective or even specific for detection of certain analytes by using different metal or non-metal nanoparticles with different shapes and sizes, as well as, by functionalization in order to favor the migration of the compounds. They also could be applied into different modalities of electromembrane extraction, as microfluidic devices.

---

## ANEXO I.

Publicaciones científicas derivadas de la tesis

---





---

Cristina Román-Hidalgo, María Ramos-Payán, Juan Antonio Ocaña-González, María Jesús Martín-Valero, Miguel Ángel Bello-López, *Agar films containing silver nanoparticles as new support for electromembrane extraction*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (2015) 1519-1525 (DOI: 10.1007/s00216-014-8375-6).

---

Cristina Román-Hidalgo, María Jesús Martín-Valero, Rut Fernández-Torres, Manuel Callejón-Mochón, Miguel Ángel Bello-López, *New nanostructured support for carrier-mediated electromembrane extraction of high polar compounds*, *Talanta* 162 (2017) 32-37 (DOI: 10.1016/j.talanta.2016.10.022).

---

Cristina Román-Hidalgo, María Jesús Martín-Valero, Rut Fernández-Torres, Miguel Ángel Bello-López, *Use of Polymer Inclusion Membranes (PIMs) as support for electromembrane extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and highly polar acidic drugs*, *Talanta* 179 (2018) 601-607 (DOI: 10.1016/j.talanta.2017.11.066).

---

Cristina Román-Hidalgo, Germán López-Pérez, María Jesús Martín-Valero, Miguel Ángel Bello-López, *Chitosan tailor-made membranes as biopolymeric support for electromembrane extraction*, *Talanta* (*En revisión*).

---

# Agar films containing silver nanoparticles as new supports for electromembrane extraction

Cristina Román Hidalgo · María Ramos-Payán ·  
Juan Antonio Ocaña-González · María Jesús Martín-Valero ·  
Miguel Ángel Bello-López

Received: 16 October 2014 / Revised: 24 November 2014 / Accepted: 27 November 2014 / Published online: 18 December 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** A new support containing silver nanoparticles to assist electromembrane extraction (EME) procedures is proposed. For the first time, synthesized agar films containing silver nanoparticles (AgNPs) have been used as a support for liquid membranes in EME. Agarose films of 20  $\mu\text{m}$  thickness containing 107.9 mg Ag/g agar were synthesized and characterized by transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM), showing isolated spherical silver nanoparticles of 20–30 nm diameter with homogeneous distribution. Nanometallic films were cut and glued to narrow bore glass tubes and used as supports for a dihexyl ether liquid membrane for use in an EME procedure. EME conditions were optimized and applied to the extraction of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The results were compared to those using polypropylene membranes (450  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$  thickness), achieving 10- to 70-fold higher extraction efficiency. This article opens a new line of research into electrically assisted microextraction systems by combining other possible kinds of nanometallic films, including different metals, film functionalization through metallic NPs, and the use of low polarity solvents. Also, very low currents are obtained during the extraction process, which lead to high electromigration of the analytes.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00216-014-8375-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. R. Hidalgo · M. Ramos-Payán · J. A. Ocaña-González ·  
M. J. Martín-Valero · M. Á. Bello-López (✉)  
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry,  
University of Sevilla, c/ Prof. García González s/n,  
41012 Seville, Spain  
e-mail: mabello@us.es

M. Ramos-Payán  
Department of Analytical Chemistry, Lineberger Cancer Center,  
The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill,  
NC 27599-3290, USA

**Keywords** Silver nanoparticles · Electromembrane extraction · Agar-nanometallic films · Non-steroidal anti-inflammatory drugs

## Introduction

Electromembrane extraction (EME) is a well-established clean-up and preconcentration procedure for the determination of several analytes in a wide range of matrixes [1]. In 2009, the research group of Prof. Pedersen-Bjergaard and Rasmussen proposed, for the first time, the application of flat membranes as supported liquid membranes (SLM) in EME procedures. They tested two polypropylene flat membranes of 25 and 100  $\mu\text{m}$  thickness in a so-called drop-to-drop configuration [2] which showed better performance for the extraction of basic analytes using 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE) as the SLM. Also, Lee et al. [3] used thin flat polymeric membranes in EME devices as supports for the liquid membranes. In this case, a polypropylene membrane sheet (157  $\mu\text{m}$  thickness, 0.2  $\mu\text{m}$  pore size) was used to build a plastic bag heat-sealing device that supports the SLM. The proposed EME procedure was applied to the extraction of chlorophenols from seawater. Finally, Pedersen-Bjergaard et al. have tested a 100- $\mu\text{m}$  polypropylene flat membrane using NPOE as the SLM for two purposes: the development of a multiwall plate EME device [4] and the study of exhaustive extractions of basic drugs [5]. From these studies, it is clear that a decrease in the membrane thickness improves the extraction performance.

Electromigration of the analytes across the SLM can also be influenced by other factors like the nature of the membrane and analytes, the applied electrical field between donor and acceptor phases, or the currents generated during extraction. In this situation, the modified Nernst–Planck equation [6] describes the electromigration of the compounds across the

SLM, as well as the parameters on which it depends (applied voltage, electrical resistance of the SLM, or system currents generated during the process) [7, 8]. It has been proved that a decrease in the system current during EME improves the extraction of the analytes [5].

Usually, polymeric materials have been used as supports in EME devices. Nevertheless, the possibility of employing other kinds of substances should be considered. In this sense, agarose is widely used in several scientific fields like biomedicine, the food industry, and immunology [9]. Agarose is a stable polysaccharide in a wide range of pH and temperatures. Owing to its chemical properties, it is an easily manipulable material, allowing the preparation of xerogel films with different thickness by simple spillage and air drying. These gel matrixes are ideal media for diffusion and electrokinetic migration of several compounds [10], and allow the incorporation of other substances like metallic nanoparticles during the gelation process.

Silver nanoparticles (AgNPs) have received considerable attention owing to their attractive physical and chemical properties. The synthesis of nanoparticles in colloidal solution requires adequate methods to control their size and shape, chemical reduction being the most used synthesis procedure.

The aim of this study is to propose a new support for liquid membranes for use in EME. Thus, we propose a new agarose thin membrane with simple preparation and handling. Agarose films were synthesized in combination with AgNPs generated in situ. Films were characterized and the influence of thickness, nanoparticles size, and experimental conditions was evaluated. A group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) were selected as target analytes and the results were compared with those obtained with polypropylene supports of different thickness.

## Experimental

### Chemicals and reagents

All chemical reagents were of analytical grade. Chloride-free agar-agar, polyvinylpyrrolidone (PVP), 1-octanol, and dihexyl ether (DHE) were obtained from Fluka-Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Silver nitrate, acetone, salicylic acid (SAC), ketoprofen (KTP), naproxen (NAX), diclofenac (DIC), and ibuprofen (IBU) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All solutions and dilutions were prepared using ultrapure water from a Milli-Q Plus water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA). Aqueous working solutions of NSAIDs were prepared daily by adequate dilutions from methanolic (KTP, NAX) and aqueous (SAC, DIC, IBU) 400 mg L<sup>-1</sup> solutions.

### Film synthesis

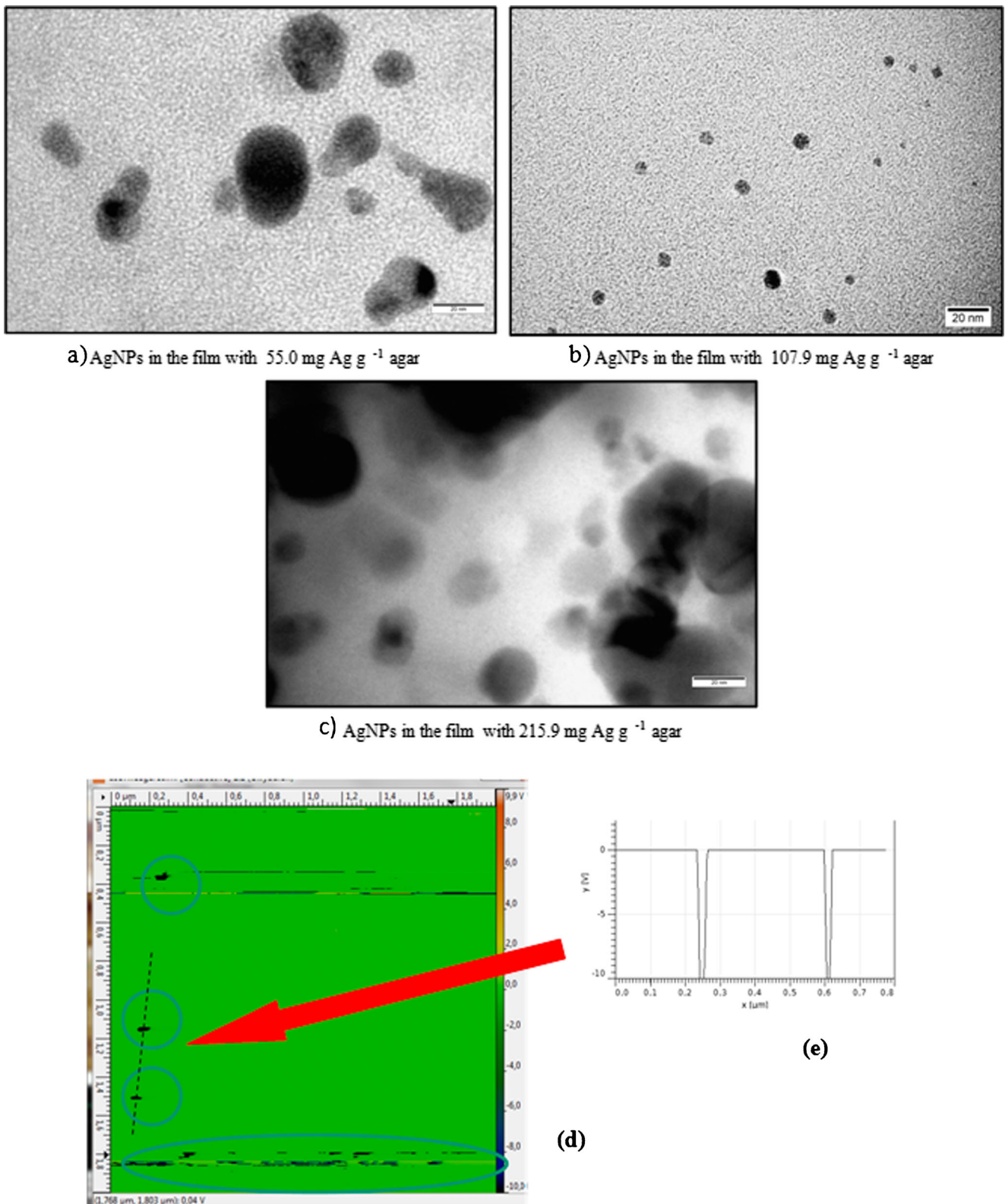
Agarose films containing AgNPs were prepared in the laboratory following the method proposed by Muthuswamy [11]: 0.5 g of chloride free agar-agar was dissolved in 50 mL of ultrapure water under boiling conditions with stirring. After the mixture was cooled to 50 °C, 30 mL of ethanol and 0.05 g of PVP were added with constant stirring. Variable amounts of AgNO<sub>3</sub> (0.043, 0.085, and 0.107 g, respectively) were dissolved in 10 mL ultrapure water and added dropwise (3 min) to the aforementioned solution. The resulting solution was heated at reflux for 2 h at 90 °C in a rotary evaporator, in the absence of light. The solution turned golden yellow as AgNPs were formed; the excess of reducing agent ensures the complete reduction of silver. Then, 5, 10, 20, and 30 mL of this solution was poured into plastic Petri dishes (8 cm diameter) and stored in darkness at room temperature until the obtained product could be peeled off as a free-standing film. Following the described procedure, 12 different films were prepared, namely four different thicknesses (20, 25, 30, and 35 µm) with three different silver loads (55.0, 107.9, and 215.9 mg Ag/g agar).

### Film characterization

Film thicknesses were checked by optical microscopy measurements. The in situ generated AgNPs in the synthesized films were characterized by means of transmission electron microscopy (TEM), using an Hitachi CM200 electron microscope working at 200 kV. Figure 1 shows TEM images for the three tested nanometallic films. Comparing the images, it can be observed that 55.0 mg Ag/g agar films (Fig. 1a) contain AgNPs with conical shape, and some of them seem to be grouped forming agglomerates of around 50–60 nm in size. On the other hand, AgNPs present in 107.9 mg Ag/g agar films (Fig. 1b) have a well-defined spherical shape with a smaller size, around 20–30 nm, and separated one from each other without forming agglomerates. In the case of 215.9 mg Ag/g agar films (Fig. 1c), it is clear that AgNPs are bigger (around 60 nm) and practically all of them form agglomerates.

In addition, conductivity maps of 107.9 mg Ag/g agar nanometallic films were obtained by using atomic force microscopy (AFM). A CSI Nano-Observer Atomic Force Microscope (Scientec Ibérica S.L., Madrid, Spain) in conductive mode (C-AFM) was used for these measurements. When conductivity maps were acquired through a scan of 2 × 2 µm (Fig. 1d), high conductivity regions (dark spots) were observed, indicating the presence of AgNPs. A linear scan (Fig. 1e) shows conductivity peak widths compatible with the presence of 20–30 nm AgNPs in the film.

The stability of the nanometallic films was also studied. Films were stored under different light and temperature conditions. Different temperatures (−18 °C, 5 °C, 20 °C, and



**Fig. 1** Nanometallic film characterization. Shape and size of the different synthesized AgNPs from TEM images (a, b, c) and AFM conductivity map in a scan of 2 μm (d). Conductivity peaks (e) correspond to the presence of isolated AgNPs

35 °C) and dark conditions were tested for 7 days. Films exposed to temperatures of - 18 °C could not be used for

developing the EME procedure because the thawing process affected the physical characteristics of the film in an

irreversible way (leading to disaggregation and breaking). Additionally, films exposed to  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  for only 1 h showed the same behavior. On the other hand, films exposed to temperatures between  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  were useful for the extraction procedure. Additionally, films were exposed to daylight as well as being conserved in darkness. For films exposed to daylight for 4 days, a metallization process took place, they acquired a mirror-like appearance, and no extraction was obtained when using them for EME. Those films preserved in darkness were optimal for the extraction procedure and could be used up to 3 months after synthesis.

#### EME proposed procedure

A Power Source 300 V (VWR International, West Chester, Pennsylvania, USA) with programmable voltage in the range 2–300 V and currents in the range 4–500 mA was used as a d.c. power supply. Two platinum electrodes (0.25 mm diameter) were placed into the sample and acceptor phase with an average interelectrode distance of 2 mm.

EME was performed according to the following procedure: dry nanometallic films were peeled off, cut, and glued to narrow bore glass tubes (4 mm diameter, 2 mm i. d., 2.5 cm length) using epoxy resin. The glass tube with the nanometallic film was soaked with DHE for 5 s and the excess organic solvent was removed with medical wipes. The glass tube was filled with 30  $\mu\text{L}$  of acceptor phase (ultrapure water) using a microsyringe and the anode was placed in the acceptor phase. The prepared glass tube was placed into a 10-mL vial containing aqueous solution (donor phase). Different voltages (10, 20, 30, 50, and 100 V) were applied for variable times (10, 20, 40, and 60 min) with sample stirring at 600 rpm.

Enrichment factors ( $E_f$ ) were calculated for each analyte as the corresponding relation between their final concentration in the acceptor phase and their initial concentration in the donor phase.

The proposed EME procedure was applied to the microextraction of some NSAIDs: salicylic acid (SAC), ketoprofen (KTP), naproxen (NAX), diclofenac (DIC), and ibuprofen (IBU). These drugs were selected as target analytes owing to our previous experience with the application of different microextraction procedures to these compounds, and in order to obtain a suitable comparison of the proposed support performance with those achieved with others. Once the extraction took place, the voltage was turned off and the acceptor phase was placed into an HPLC microvial and injected into the HPLC instrument using an HPLC syringe (20  $\mu\text{L}$ ). Chromatographic analysis was carried out according to Ramos et al.'s procedure [12]. The extraction device can be reused at least three times without loss of extraction efficiency.

#### Results and discussion

In previous studies [13], it was established that DHE is the better SLM for hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) of anti-inflammatory drugs. However, DHE cannot be used for EME purposes if polypropylene hollow fibers are used as supports [12] because of power cuts. Preliminary studies of possible solvents to be used as the SLM using the proposed nanometallic agar films showed that better NSAIDs extraction performance was obtained using DHE as the SLM. So, this solvent was selected as optimum for the EME optimization.

The influence of the pH of the acceptor and donor phases in the pH range 1–12 was also studied. Agarose films broke at pH 1 and showed increasing extraction efficiency up to pH 4–5. From pH 5 to 12, the efficiency of the extractions was practically constant for all the selected NSAIDs. Owing to the nature of the selected analytes, EME experiments were developed without pH control, the pH of the acceptor phase being around 5.6 (ultrapure water) and the pH of the donor phase being slightly more acidic as a result of the nature of the analytes. A detailed description of the influence of pH on the EME procedure can be consulted in the Electronic Supplementary Material (ESM) (Fig. S1).

In order to check the influence of the AgNPs in the film (including its thickness) on the EME procedure, the determination of NSAIDs was carried out using films of different thickness (20, 25, 30, and 35  $\mu\text{m}$ ). Also for each thickness, films without AgNPs and with AgNPs of different silver load (55.0, 107.9, and 215.9 mg Ag/g agar, respectively) were tested. Therefore, EME was performed using four batches of films. The obtained enrichment factors ( $E_f$ ) for each film are depicted in Table 1.

In the case of 55.0 mg Ag/g agar films, thinner films (20 and 25  $\mu\text{m}$ ) led to practically no or very low ( $<0.3$ ) enrichment factors in all cases. Films with a silver load of 215.9 mg Ag/g agar with 30  $\mu\text{m}$  and 35  $\mu\text{m}$  thickness became unstuck from the capillary during the extraction; thinner films (20 and 25  $\mu\text{m}$ ) led to enrichment factors lower than 0.6 for most of the analytes, with enrichment factors of only 1.2 and 1.5 for diclofenac and ibuprofen, respectively.

On the other hand, efficient extraction was obtained for all the analytes with films of 107.9 mg Ag/g agar silver load, corresponding to spherical and isolated 20–30 nm AgNPs. For 35  $\mu\text{m}$  films, the enrichment factors values were between 0.0 and 3.2 for all the analytes. When the thickness of the film was 30  $\mu\text{m}$ , the values of  $E_f$  improved slightly, being between 0.2 and 5.3. This improvement was enhanced with thinner films, which is confirmed in the case of 20  $\mu\text{m}$  thickness with  $E_f$  values higher than 2.5 for all the analytes (being around 15 for SAC).

In the case of films without AgNPs, 35  $\mu\text{m}$  films became unstuck from the capillary during the extraction. Films with

**Table 1** Enrichment factors obtained in the extraction for each of the tested agar silver nanometallic films

Enrichment factors <sup>a</sup>		Films containing AgNPs with different thickness													
Analyte	Films without AgNPs	215.9 mg Ag g <sup>-1</sup> agar			107.9 mg Ag g <sup>-1</sup> agar			55.0 mg Ag g <sup>-1</sup> agar							
		20 μm	25 μm	30 μm	35 μm	20 μm	25 μm	30 μm	35 μm	20 μm	25 μm	30 μm	35 μm		
SAC	0.9	0.7	0.3	<sup>b</sup>	0.1	0.0	*	15.3	5.3	5.3	3.2	0.3	0.2	0.2	ND
KTP	0.5	0.3	0.1	<sup>b</sup>	0.3	0.3	*	3.4	2.4	2.5	1.2	0.2	0.1	0.1	ND
NAX	0.7	0.3	0.1	<sup>b</sup>	0.5	0.1	*	2.5	0.6	0.5	0.3	0.1	0.0	0.0	ND
DIC	0.8	0.6	0.2	<sup>b</sup>	1.2	0.1	*	2.7	1.5	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	ND
IBU	0.9	0.7	0.3	<sup>b</sup>	1.5	0.2	*	2.6	2.8	0.7	1.0	0.1	0.1	0.1	ND

ND not detected

<sup>a</sup> All data calculated as average of triplicate determinations %RSD < 6<sup>b</sup> Became unstuck during extraction

30 μm thickness led to low  $E_f$  values ( $\leq 0.3$ ) and thinner films (20 and 25 μm) slightly improved  $E_f$ .

From all these experiments, better enrichment factors are obtained when the films used are thinner (20 μm). On the other hand, the characteristics of the AgNPs included in the film have a big influence on the ability to carry out the extraction procedure. Thus, the improvement in extraction efficiency is not based solely on the presence of AgNPs, but also on their nature (i.e., their morphology, size, and distribution).

Voltage and extraction time optimization was also carried out, using films with silver load of 107.9 mg Ag/g agar and 20 μm thicknesses. From this study, it can be concluded that better results were obtained with applied voltages of 50 V and extraction time around 40 min (see ESM Table S1), as an average.

Accordingly, the selected experimental condition to carry out EME procedures can be summarized as follows: agarose films with a silver load of 107.9 mg Ag/g agar (20–30 nm diameter, spherical AgNPs) and 20 μm thickness, DHE as the SLM, and constant 50 V d.c. during 40 min with continuous stirring at 600 rpm.

Also, system currents were registered during the EME process. Registered currents were lower than those obtained from agarose films without AgNPs. This fact confirms that decreasing system current during EME improves the extraction of the analytes, as mentioned in the literature [5].

An important characteristic of nanometallic films as supports of liquid membranes for EME is the possibility of their reuse for several consecutive extractions, with the consequent reduction in cost of analyses, analysis time, and handling difficulty. It is remarkable that nanometallic films can be used up to three times without loss of extraction efficiency.

#### Evaluation of nanometallic film as support of liquid membrane for EME

In order to compare the extraction performance of the synthesized nanometallic film with that other supports, different polypropylene membranes were tested using the same EME

**Table 2** Comparison of enrichment factors from the use of different supports

	Agarose film <sup>a</sup>	Polypropylene sheet 6S/2 <sup>a</sup>	PP 1E <sup>a</sup>
SAC	15.3	0.1	0.2
KTP	3.4	0.1	0.6
NAX	2.5	0.1	0.7
DIC	2.7	0.2	0.6
IBU	2.6	0.2	0.7

<sup>a</sup> Average of triplicate determinations %RSD < 6

device, and their extraction results were compared with those obtained with the proposed agarose nanometallic film under the optimal conditions described above.

Experiments were carried out using a sheet-opened polypropylene hollow fiber and a thin (100  $\mu\text{m}$ ), flat, and porous polypropylene membrane as supports. In the first case, a S6/2 Accurel<sup>®</sup> polypropylene hollow fiber (1,800  $\mu\text{m}$  i.d., 450  $\mu\text{m}$  wall thickness, and 0.2  $\mu\text{m}$  pore size) (Membrana, Wuppertal, Germany) was carefully opened with a cutter and submerged in acetone for washing. Once dried, a small piece was glued (using special glue for plastic) to a narrow bore glass tube, in order to obtain identical EME devices to the proposed ones. In the same way, Accurel<sup>®</sup> PP 1E (R/P) flat and porous polypropylene membrane (100  $\mu\text{m}$  thickness) (Membrana, Wuppertal, Germany) was glued to prepare EME devices. The EME procedure was applied to the same analytes (NSAIDs) using the optimal experimental conditions (voltage, time of extraction, sample volume, etc.) of earlier experiments with hollow fibers developed by our group [12].

The obtained results, compared to those from the AgNPs agarose film in the optimal extraction conditions, are depicted in Table 2. It can be seen that EME experiments using sheets from polypropylene hollow fiber offers the lowest enrichment factors ( $\leq 0.2$ ) for all the compounds. On the other hand, using flat polypropylene membrane as the support for EME led to slightly improved enrichment factors (0.2–0.7), which could be related to the low thickness of the PP 1E membrane. As can be seen, the obtained enrichment factors for agarose AgNPs films are around 10- to 30-fold higher and even 70-fold higher for SAC.

According to the obtained data, it is clear that the use of supports of lower thickness improves the EME performance, in accordance with that reported by Pedersen-Bjergaard and Eibak [2, 4]. However, the better EME performance of the proposed agarose-AgNPs film when compared to polypropylene ones cannot be solely attributed to their thickness, as the presence of spherical and isolated AgNPs is a determinant factor in the EME improvement. The presence of AgNPs in the films homogenizes the electrical field across the support and also leads to low intensities during the extraction process. This fact improves the migration of the analytes and, hence, the performance of the extraction procedure. Also, the proposed film could take advantage of the singular interactions of nanometallic particles with some functional groups. This way, selective (or even specific) agarose films could be synthesized for their application to selected compounds.

## Conclusions

Agar nanometallic films have been proposed as support of liquid membranes for EME procedures. In this paper, 20- $\mu\text{m}$ -

thickness nanometallic films containing spherical and isolated AgNPs of 20–30 nm size have been tested in EME procedures for the determination of selected NSAIDs, affording better results than other traditional polypropylene supports (as hollow fibers and flat membranes). Besides, this new support leads to low system currents during the extraction procedure, improving the electromigration of analytes

It is remarkable that the synthesis of the proposed nanometallic films is an easy and tunable procedure that allows the selection of film thickness and nanoparticle characteristics, in order to improve the extraction efficiency. In addition, the proposed device can be reused for at least three times, minimizing time and cost of analysis.

This initial research leads to a new and wide perspective in using nanometallic films as versatile and tunable supports for liquid membranes in EME. These supports open new horizons in sample pretreatment by using the singular properties of nanostructured systems, constituting the first stage of promising new supports for electromembrane extractions based on flat supports.

Nanometallic films are a wide potential field owing to the possibility of using different metal nanoparticles (gold, silver, nickel, copper, etc.), shapes (spherical, triangular, plates, rods), and sizes. Also, metal nanoparticles could be used to synthesize functionalized or even multi-functionalized supports for EME. In this way, these supports become selective or even specific in the detection of certain analytes in the presence of others.

An additional advantage of nanometallic films as EME supports is that they can be self-manufactured according to the requirements of each experiment, including thickness control. In the case of other traditional supports, as hollow fibers or flat membranes, their characteristics (thickness, porosity, etc.) are limited to those provided by commercial suppliers.

**Acknowledgements** The authors thank Dr. F. Varela (CITIUS, University of Sevilla) for his assistance with the Hitachi CM200 electron microscope for electron microscopy studies and F. Martínez (Scientec Iberica S.L.) for his assistance in the AFM measurements.

The authors are grateful to Prof. Stig Pedersen-Bjergaard for kindly providing us Accurel<sup>®</sup> PP 1E (R/P) flat membrane.

This work has been supported by the Project CTM2012-38720-C03-01 from the “Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional de I + D + I” (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain).

## References

1. Bello-López MA, Ramos-Payán M, Ocaña-González JA, Fernández-Torres R, Callejón-Mochón M (2012) Analytical applications of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME): a review. *Anal Lett* 45:804–830
2. Petersen NJ, Jensen H, Hansen SH, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2009) Drop-to-drop microextraction across a supported

- liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions. *J Chromatogr A* 1216:1496–1502
3. Lee J, Khalilian F, Bagheri H, Lee HK (2009) Optimization of some experimental parameters in the electro membrane extraction of chlorophenols from seawater. *J Chromatogr A* 1216:7687–7693
  4. Eibak LEE, Parmer MP, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Gjelstad A (2014) Parallel electromembrane extraction in a multiwell plate. *Anal Bioanal Chem* 406(2):431–440
  5. Huang C, Eibak LEE, Gjelstad A, Shen X, Trones R, Jensen H, Pedersen-Bjergaard S (2014) Development of a flat membrane based device for electromembrane extraction: a new approach for exhaustive extraction of basic drugs from human plasma. *J Chromatogr A* 1326:7–12
  6. Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard SJ (2007) Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation. *J Chromatogr A* 1174:104–111
  7. Balchen M, Halvorsen TG, Reubsæet L, Pedersen-Bjergaard S (2009) Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction. *J Chromatogr A* 1216(41):6900–6905
  8. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (2006) Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: new concept for rapid sample preparation of biological fluids. *J Chromatogr A* 1109:183–190
  9. Armisen R (1991) Agar and agarose biotechnological applications. *Hydrobiologia* 221:157–166
  10. Armisen R, Galatas F (1987) Properties and uses of agar. In: Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fisheries Technical Paper 288
  11. Muthuswamy E, Ramadevi S, Vasan HN, Garcia C, Noé L, Verelst M (2007) Highly stable Ag nanoparticles in agar-agar matrix as inorganic–organic hybrid. *J Nano Res* 9(4):561–567
  12. Ramos Payán M, Bello López MA, Fernández Torres RM, Villar Navarro M, Callejón Mochón M (2011) Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples. *Talanta* 85:394–399
  13. Payan MR, López MAB, Fernández-Torres R, Bernal JLP, Mochón MC (2009) HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME). *Anal Chim Acta* 653:184–190





## New nanostructured support for carrier-mediated electromembrane extraction of high polar compounds



Cristina Román-Hidalgo<sup>a</sup>, María Jesús Martín-Valero<sup>a</sup>, Rut Fernández-Torres<sup>a,b</sup>,  
Manuel Callejón-Mochón<sup>a</sup>, Miguel Ángel Bello-López<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de Sevilla, c/Prof. García González, s/n, 41012 Seville, Spain

<sup>b</sup> Research Centre of Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Electromembrane extraction  
Nanostructured polymeric support  
Polar compounds

### ABSTRACT

A new support has been proposed to be used for carrier-mediated electromembrane extraction purposes. The new support (Tiss<sup>®</sup>-OH) is a 100 μm thickness sheet nanofiber membrane manufactured by electrospinning and composed by acrylic nanofibers. It has been used in an electromembrane extraction (EME) combined with a HPLC procedure using diode array detection. The proposed method has been used for the extraction of four high polarity acidic compounds: nicotinic acid, amoxicillin, hippuric acid and salicylic acid. Analytes were extracted from an aqueous sample solution (pH 4) (donor phase) using a Tiss<sup>®</sup>-OH sheet that supports a 5% (w/v) Aliquat<sup>®</sup>336 in 1-octanol liquid membrane. Aqueous solution (pH 6) was used as acceptor phase. The electrical field was generated from a d.c. electrical current of 100 V through two spiral shaped platinum wires placed into donor and acceptor phases. Analytes were extracted in 10 min with recoveries in the 60–85% range. The proposed EME procedure has been successfully applied to the determination of the target analytes in human urine samples.

### 1. Introduction

For several years, extraction across supported liquid membranes (SLM) have been an interesting and explored topic in order to concentrate and cleaning biological and environmental samples to be analyzed by chromatography or electrophoresis. In 1996, Liu [1] and Jeannot [2] proposed the use of a small drop of a water-immiscible organic solvent to extract some compounds from aqueous solutions. Liquid phase microextraction (LPME) methodologies have evolved to several approaches and nowadays they have become practical and attractive alternatives to other well established extraction procedures.

Using the proposal of Audunsson [3], Thordarson et al. [4] and later Pedersen-Bjergaard and Rasmussen [5] introduced an interesting approach based on the use of porous polypropylene hollow fibers, a low-cost material that allows an excellent support for several organic solvents to be used as SLM. The disposable nature of this material avoid undesired carry over between extracted samples. In function of the nature of the donor and acceptor phases, two and three phase configurations have been developed [7]. Additionally, in order to improve the extraction performance for some analytes, the use of certain substances named “carriers” has been proposed. The use of carriers intends a better solubilization and migration of the analytes

into the SLM, allowing the applicability of SLM extraction to a variety of compounds such as permanently charged chemical species. The use of different kinds of dissolved carriers in the different phases has been proposed [7–9].

In 2006, Pedersen-Bjergaard and Rasmussen [7] proposed the use of electric fields in order to improve the extraction performance of three phase hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) devices for polar compounds. This new microextraction approach was termed electromembrane extraction (EME).

In the last years the number of analytical applications that use HF-LPME or EME have been considerably increased and several reviews and papers revising the fundamentals and applications of these microextraction procedures have been published [6,10–12], being polypropylene membranes (hollow fibers or planar membranes) the most popular support [6].

Most usual configuration for EME consists in two wires placed into both donor and acceptor phases of a typical three phase HF-LPME. However, planar polypropylene membranes in different configurations have been also used [13–16].

An interesting approach in HF-LPME consists in the use of carriers that could promote ion pairs formation with charged compounds of interest. The role of carriers is the formation of pseudo-neutral species

\* Corresponding author.

E-mail address: [mabello@us.es](mailto:mabello@us.es) (M.Á. Bello-López).

in order to get a better solubilization of compounds in the organic SLM. Thus, for EME purposes the use of carriers is restricted to donor phase and/or SLM because it is necessary an electromigration to the acceptor phase which needs charged compounds. The use of dissolved carriers into the SLM is the more extended approach [17–20]. In this configuration, charged compounds migrate from donor phase to the SLM and afterwards, these compounds are dissolved into the organic phase as ion-pair. The application of an electric field promotes the migration of dissolved analytes from the SLM to the acceptor phase.

EME for the most polar (acidic and basic) compounds shows, in general, recovery decreases when polarity increases, even if carrier-mediated approaches are used [13]. Thus, recoveries in the 4–17% range have been reported for high polar basic drugs ( $\log P < 1$ ) using di-(2-ethylhexyl)-phosphate (DEHP) as carrier into the supported liquid membrane (SLM).

To this time, the different approaches for the use of SLM in both, HF-LPME and EME devices, consider the support as a simple porous and inert physical receptor of the organic phase. Recently, Román-Hidalgo et al. [21] have described the use of agar films containing silver nanoparticles as new supports for electromembrane extraction. This paper has opened a new topic with the consideration of the support as possible active part in the extraction processes.

Within this realm, the present work has been focused in the use of a highly polar nanostructured support (Tiss®-OH) to be use in an EME configuration in order to extract highly polar compounds. Tiss®-OH is a 100  $\mu\text{m}$  thickness sheet nanofiber membrane manufactured by electrospinning. The chemical composition of these sheets consists in acrylic nanofibers, containing high density of –OH groups. As target analytes, four high polar compounds have been selected: nicotinic acid ( $\log P$  0.4), amoxicillin ( $\log P$  –1.56), hippuric acid ( $\log P$  0.7) and salicylic acid ( $\log P$  2.2). Nicotinic acid, also known as niacin, and its amide (nicotinamide) are the common forms of the B3-vitamin. This vitamin is one of the main essential human nutrients. Therefore, this compound has an important role in several biochemical and biological processes and in some human diseases [22,23]. On the other hand, hippuric acid is one of the human major urinary endogenous metabolites. High concentrations for this compound in urine have been reported as possible cause of certain children diabetes and renal failures [24,25]. High hippuric acid concentrations could be also indicated possible toluene intoxication [26]. Salicylic acid is a widely used compound in pharmaceuticals and cosmetics due to its anti-inflammatory and antiseptic properties [27,28]. Amoxicillin is a semi-synthetic antibiotic, acid stable, analog of ampicillin, with a broad spectrum of bactericidal activity against many microorganisms (gram-positive and gram-negative) due to the presence of a benzyl ring in the side chain. It is normally used for the treatment of common bacterial infections such as pneumonia, bronchitis, venereal disease, and ear, lung, nose, urinary tract, and skin infections. It may also be used before surgery or dental work to prevent infection [29].

In order to develop the extraction of these four selected high polar compounds, a home-made device has been designed for the use of the new nanostructured support in EME procedure. The optimization of the experimental EME parameters has been carried out and the use of a cationic carrier (Aliquat 336®) has been considered and discussed. Additionally, it can be pointed out that to our knowledge no carrier-mediated EME for acid compounds has been previously published.

The proposed EME procedure was applied to the extraction of four high polarity compounds: nicotinic acid (NIC), amoxicillin (AMX), hippuric acid (HIP), and salicylic acid (SAC). These analytes were selected in order to compare the efficiency of the new nanostructured support used in the proposed EME procedure with other supports previously used in reported EME designs for highly polar compounds [8,9,30].

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were of analytical grade. Amoxicillin (AMX), salicylic acid (SAL), nicotinic acid (NIC), acetic acid, 1-octanol and Aliquat®336 were obtained from Fluka-Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Hippuric acid (HIP) was obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Sodium hydroxide, hydrochloric acid, acetic acid and sodium acetate, sodium dihydrogen phosphate, ammonia and ammonium chloride were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All solutions and dilutions were prepared using ultrapure water from Milli-Q Plus water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA). Working solutions were daily prepared by adequate dilutions from aqueous solutions ( $400 \text{ mg L}^{-1}$ ) of NIC, AMX, HIP and SAL.

### 2.2. Nanofiber membranes as support for EME

Nanofiber membranes have been used as support for developing EME procedure. These membranes were kindly provided by nanoMyP® (Granada, Spain). Tiss® Series is a family of polymeric nonwoven nanofiber membranes made by electrospinning with several chemical functionalisation and/or doped with metal nanoparticles [31]. These membranes have a very high specific surface; they are highly hydrophilic but insoluble in aqueous media as well as in apolar solvents (oil, toluene...) and have excellent mechanical properties: easily manipulated, high mechanical strength, high abrasion resistance, high flexibility, temperature resistance (up to 100 °C) and aqueous and aqueous / organic resistance without changing the structure of the fibers. In addition, they have excellent chemical properties, based on NanoMyP® patented technology, for direct covalent immobilisation of a high load of almost any type of biomolecule (enzyme, antibody, antigen ...) under mild temperature and pH conditions and short time period. These products are highly versatile and very good candidates for the chemical immobilisation of any type of molecule (biomolecule, drug, dye, nanoparticle...).

Also, it is remarkable that Tiss®-OH behave as excellent support for the liquid membrane in EME, besides their nanostructured nature, mainly due to their hydrophilic properties. SLM stability is a critical issue in EME, nevertheless this new support offers an easy and problem free immobilization of the SLM. On the other hand, no significant problems of stability of the liquid membrane have been found even when high voltages were applied.

In this work, the support for the liquid membrane in EME procedure has been a 100  $\mu\text{m}$  thickness sheet nanofiber membrane (Tiss®-OH), which is a nonwoven nanofiber membrane functionalised with hydroxyl groups. In these nanofiber membranes, the pore size between fibers is variable, being 800 nm for dry nanofibers or 1–3  $\mu\text{m}$  for wet nanofibers. Fig. 1 shows an image of the Tiss®-OH, obtained by Transmission Electron Microscopy (TEM), where fibers of nanometric size in the membrane structure can be observed.

### 2.3. EME proposed procedure

A Power Source 300 V (VWR International, West Chester, Pennsylvania, USA) with programmable voltage in the range 2–300 V and providing currents in the range 4–500 mA was used as d.c. power supply. EME procedure was developed according to the following home-made design: 2 mL 2-SV glass micro vial with screw plug (Chromacol, Welwyn Garden City, UK) was used as sample compartment. The bottom of the micro vial was previously cut for housing the acceptor solution. 100  $\mu\text{m}$  thickness sheet dry nanofiber membrane (TISS®-OH) was placed in the glass micro vial plug, screwing it in order to seal the compartment by pressure, making it hermetic. The micro vial, sealed with the plug (containing the nanofiber membrane) was soaked with an organic solution (5% (w/v) Aliquat®336 in 1-octanol)

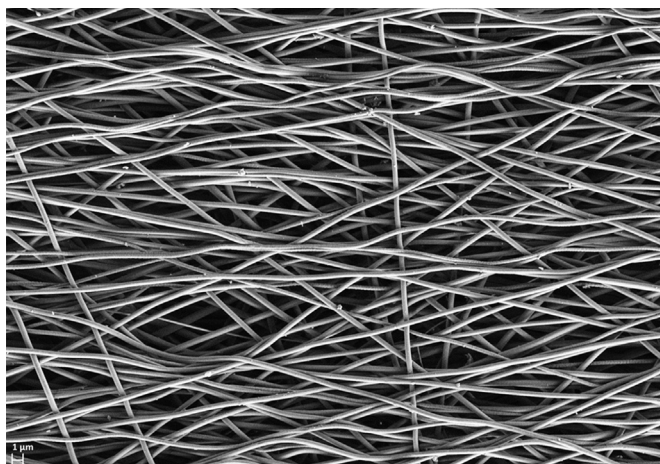


Fig. 1. TEM image of de Tiss®-OH nanofibers membrane.

for 5 s, removing the excess of organic solvent with medical wipes. The micro vial was put upside down in order to fill it with 300  $\mu\text{L}$  of acceptor phase (pH 6). Two spiral ended platinum electrodes (0.25 mm diameter) were placed into both donor (10 mL pH 4) and acceptor phase, being connected to the DC power supply as can be seen in Fig. 2. 100 V was applied for 10 min with sample stirring at 300 rpm, obtaining an average current during the extraction of 4.5 mA. After 10 min of EME, the voltage was turned off; the acceptor solution was collected with a microsyringe, and then transferred to a microinsert to be injected to the chromatograph.

#### 2.4. Chromatographic conditions

The HPLC system consisted of an Agilent (Palo Alto, CA, USA) 1100 Series liquid chromatograph equipped with a diode array detector (DAD), a manual injector with a 20  $\mu\text{L}$  loop, a quaternary pump, a vacuum degasser and a thermostated column compartment. The analytical cartridge column was a LiChroCART® 75-4 Purosphere® STAR RP-18e 3  $\mu\text{m}$  (75 mm $\times$ 4.0 mm i.d.) (VWR, Darmstadt, Germany) with a Kromasil® 100 Å, C18, 5  $\mu\text{m}$  (15 mm $\times$ 4.6 mm i.d.) (Scharlab S.L., Barcelona, Spain) guard column. The chromatographic separation was performed at 20 °C. The mobile phase consisted in a 0.05% formic acid (component A) and acetonitrile (component B). Gradient elution was used at a flow rate of 0.8 mL  $\text{min}^{-1}$ . Table 1 shows the gradient conditions. The monitoring wavelengths for DAD detection are 260 nm for NIC, 230 nm for AMX, 235 nm for HIP and 235 nm for SAL,

**Table 1**  
Gradient conditions for the chromatographic analysis. A: Aqueous formic acid (0.05%, v/v); B: Acetonitrile.

t (min)	A (%)	B (%)
0	99	1
3	90	10
4	90	10
4,1	60	40
12	60	40

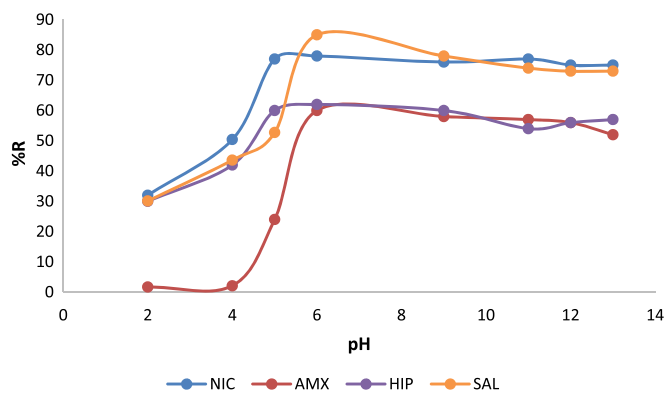


Fig. 3. Influence of the acceptor phase pH.

respectively.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Preliminary assays

In previous studies developed in our research group, diethyl ether (DHE) and 1-octanol have been used as SLM in different EME procedures. In all cases, the nature of the SLM support (hollow fiber or nanometallic agar film) conditioned the organic solvent selected for SLM [21,32,33]. Therefore, and according to these previous experiences, DHE and 1-octanol were tested, achieving better recoveries (20–35%) for all the tested analytes when using 1-octanol. Thus this solvent was selected as organic solvent for SLM.

On the other hand, due to the fact that the use of carriers can improve the extraction of polar compounds [7] and taking into account that, in the donor phase, the target analytes are mostly in deprotonated form, a cationic carrier (Aliquat®336) was dissolved in 1-

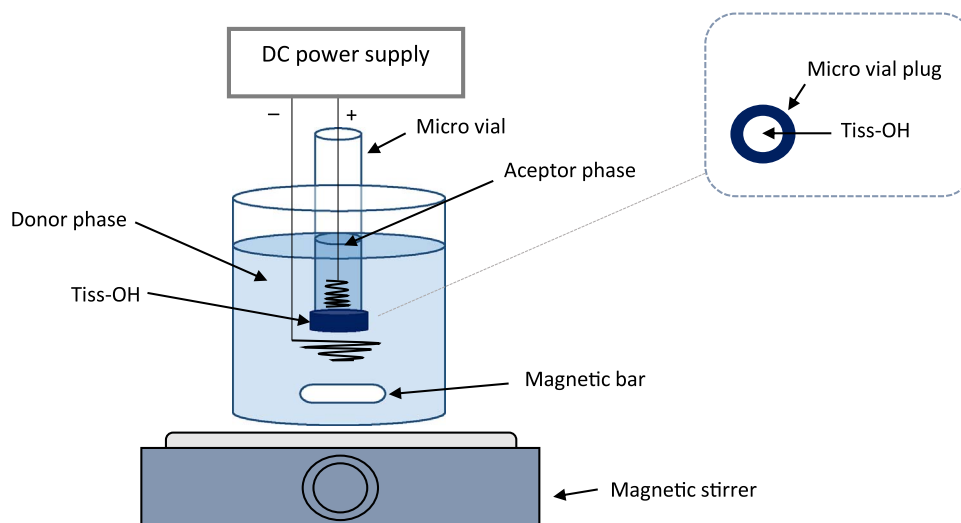


Fig. 2. Experimental design for EME procedure.

**Table 2**  
Calibration data, Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ) for the target analytes.

Analyte	Linear range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Linearity		LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recovery (%)
		(%)	( $R^2$ )			
NIC	173.3–4000.0	99.8	0.9976	112.0	373.3	77
AMX	1322.1–3000.0	98.9	0.9887	402.3	1322.1	60
HIP	706.0–3000.0	99.5	0.9946	211.8	706.0	62
SAL	781.7–3000.0	99.3	0.9926	234.5	781.7	85

<sup>a</sup> LOD and LOQ according to the effective recoveries.

**Table 3**  
NIC, AMX, HIP and SAL recoveries (%) using EME/HPLC from spiked human urine samples.

Urine spiked concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	NIC <sup>a</sup>	AMX <sup>a</sup>	HIP <sup>a</sup>	SAL <sup>a</sup>
50	90.2	< LOQ	< LOQ	< LOQ
100	94.6	< LOQ	89.2	82.0
200	98.0	93.3	95.3	86.4

<sup>a</sup> Average of three determinations (%RSD < 6).

octanol 5% (w/v), to be used as SLM in the EME procedures. Thus, first experiences were run using the proposed procedure described in previous section, applying 100 V during 10 min of extraction, stirring at 300 rpm. This voltage was selected due to the fact that higher voltages led to an increase of the acceptor phase volume during extraction whereas poor extractions occurred in the case of applying lower voltages.

From this starting point, different experimental factors were studied in order to optimize the efficiency in the extraction procedure for the selected analytes: pH and volume of both, acceptor and donor phases, extraction time and amount of carrier in the organic solvent used as SLM.

### 3.2. Influence of pH of donor and acceptor phases

10 mL of a standard aqueous solution containing the target compounds ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) was used as donor phase. 300  $\mu\text{L}$  of aqueous solution was used as acceptor phase. Lower volumes of both phases cannot be used due to the experimental design of the EME device.

It is noticeable that in EME devices, the possible influence of water electrolysis must be considered. Bubbles formation and, specially, the appearance of electrolytic generated  $\text{OH}^-$  and  $\text{H}^+$  can provoke severe pH changes in both donor and acceptor solutions and consequently can affect to the extraction performance [34–37]. In our case, it has been checked that, the electrolysis in the acceptor phase leads to an important pH decrease during the extraction process, which can be especially significant. Therefore, the use of different buffer solutions to check the pH influence in this phase was considered [37]. This way, a practically constant pH value in acceptor phase is ensured. In the same way, the possible occurrence of water electrolysis into the donor phase was also studied. After EME process, it was checked an important pH increase into donor phase, reaching approximately pH 11. This fact has a synergic effect in the extraction process due to the pKa values of the target analytes. At higher pH, analytes are mostly in ionic form, which favors their extraction as ion pair.

Thus, donor phase containing the target analytes ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) without pH control (aprox. pH 4) were submitted to EME at 100 V during 10 min, using adequate 100 mM acetate, phosphate or ammonia buffer solutions as acceptor phase (in order to cover a pH range of 4–10). Results obtained are shown in Fig. 3. As it can be seen, recoveries increase for all analytes when pH increases remaining practically constant for values higher than 5.5. So a 100 mM pH 6 acetate/acetic buffer was used as optimal acceptor phase for the next experimental

optimizations.

### 3.3. Influence of time of extraction

A range of 5–15 min was studied. Recoveries increased with time of extraction up to 10 min. For higher times of extraction, acceptor phase volume increased. Due to the nanostructured nature of the nanofiber membrane, the presence of nanometric paths through the support could make relevant the electroosmotic flow allowing water flow from donor to acceptor phase. For extraction times lower than 10 min, this effect does not affect significantly the volume phase ratio. Thus, 10 min was used as optimal time of extraction.

### 3.4. Influence of donor and acceptor phases volume

Volume ratio of donor/acceptor phases was also studied. In the case of acceptor phase, volumes lower than 300  $\mu\text{L}$  were not possible to be tested due to the extraction system shape. Therefore, maintaining 300  $\mu\text{L}$  of acceptor phase, volumes of donor phase ranging between 10 and 100 mL were tested. Higher recoveries were obtained for 10 mL of donor phase. Additionally, using 10 mL volume of donor phase, different (higher) acceptor phase volumes were tested without improving the obtained recoveries. Therefore, 300  $\mu\text{L}$  and 10 mL were selected as optimal volumes for both acceptor and donor phase, respectively.

### 3.5. Influence of carrier concentration

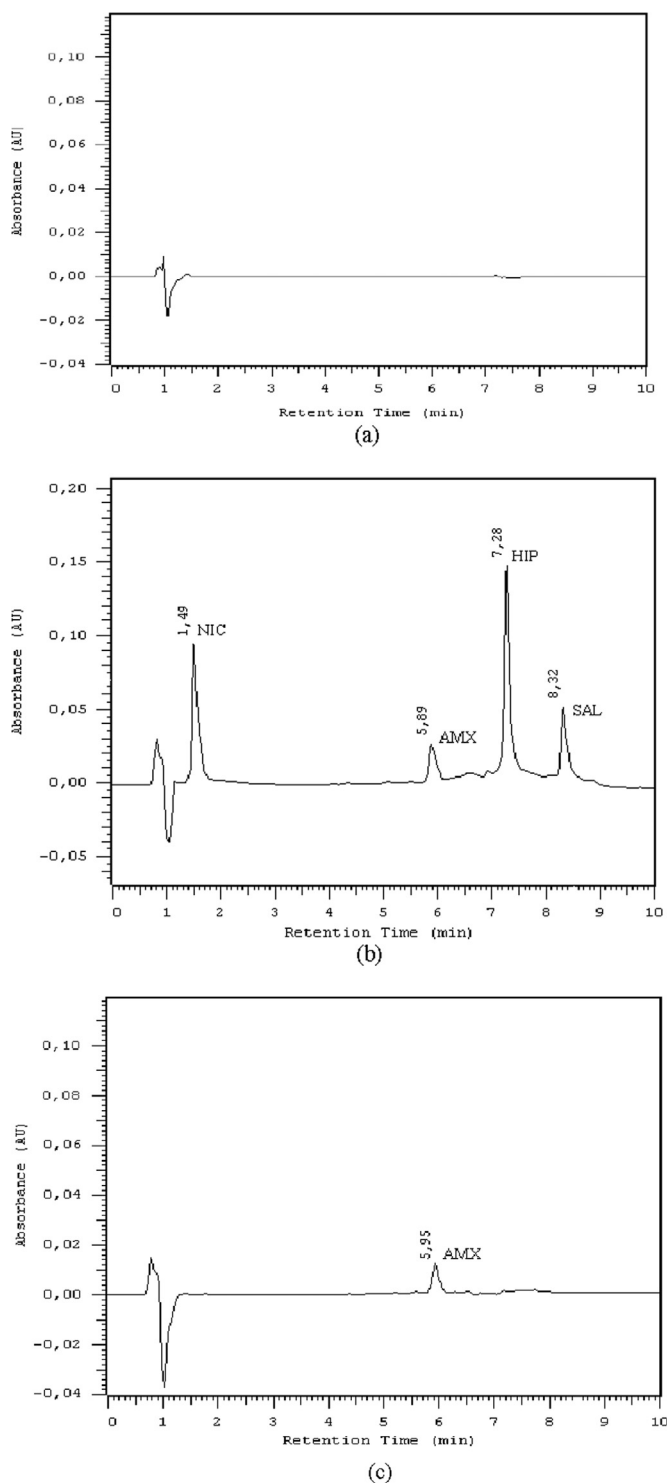
Different EME experiences using several amounts of carrier dissolved in 1-octanol were carried out in order to evaluate the influence of the carrier concentration. Concentrations of carrier ranging 2.5–7% (w/v) were tested. Recoveries increased when using higher concentrations of carrier up to 5% (w/v), keeping the obtained values of recoveries practically constant for higher amounts. Thus, 5% (w/v) was established as optimal amount of carrier.

### 3.6. Validation of the EME procedure

Using all previously established optimal experimental conditions, the recoveries obtained for the target analytes using the proposed EME procedure were 77% for NIC, 60% for AMX, 62% for HIP and 85% for SAL, respectively. Therefore, nanofiber membranes Tiss®-OH could be an adequate choice as support for electromembrane extraction of highly polar acidic compounds. Additionally, as it was mentioned in the experimental section, its excellent mechanical properties, as well as their chemical versatility, leads to consider this material as a promising support for the extraction of compounds of very different nature.

Once optimized the EME procedure using the new nanostructured support, linearity, sensitivity and precision were evaluated.

The calibration data of the chromatographic method are depicted in Table 2. Linear ranges, limits of detection (LOD) as well as limits of quantitation (LOQ) were calculated for the target analytes, according to the obtained recovery in the final sample. LOD and LOQ were calculated as three times signal to noise ratio and ten times signal to noise ratio, respectively [38]. As it can be seen, good linearity was



**Fig. 4.** HPLC chromatograms of human urine samples submitted to the EME procedure. (a) Blank human urine sample; (b) Human urine sample spiked at 200 mg L<sup>-1</sup>; (c) Human urine sample collected 7 h after an oral administration of 750 mg of amoxicillin.

obtained for all the compounds, ranging the linearity between 99.8% and 98.9%; also good regression coefficients were obtained. LODs range between 112.0 µg L<sup>-1</sup> for NIC and 402.3 µg L<sup>-1</sup> for AMX. LOQs range between 373.3 µg L<sup>-1</sup> for NIC and 1322.1 µg L<sup>-1</sup> for AMX.

The repeatability and the intermediate precision of the proposed method was evaluated applying the procedure to urine samples, measuring in one single day and two days per week during three weeks, respectively. The obtained %RSD were between 6–8% for repeatability and 8–10% for intermediate precision.

Once the validation parameters were calculated, the development EME method provides good performance in terms of precision, linearity, LODs, LOQs and recoveries.

### 3.7. Application to human urine samples

The EME procedure with the new nanostructured support has been evaluated for the determination of the target analytes in human urine samples.

Urine samples collected from healthy volunteers were microfiltered (0.22 µm), spiked at three concentration levels of NIC, AMX, HIP and SAL and diluted with ultrapure water (1:100, v/v) and. Then, samples were submitted to the EME procedure described in previous section. Finally, the obtained extracts were injected in the chromatographic system. The obtained results are depicted in Table 3. For a concentration of 50 mg L<sup>-1</sup> only nicotinic acid recovery could be evaluated; method's recoveries and sensitivities do not allow the recovery evaluation for the rest of analytes being the obtained signal under the quantitation limits. This situation persists in the case of amoxicillin at a concentration of 100 mg L<sup>-1</sup>. For the spiked condition whose recoveries can be evaluated, as can be seen in the table, there is a good agreement between the spiked amount of each analyte and the determined amount by HPLC after the EME protocol. The obtained recoveries ranged between 82% and 98%, according to the effective recoveries (taking into account the method extraction yield indicated in the validation section).

On the other hand, urine samples collected after the administration of oral doses of 750 mg AMX after 30 min and 7 h, respectively, of AMX ingestion were also submitted to the EME procedure and analyzed. In the case of the urine sample collected after 30 min of the ingestion, AMX was not detected, nevertheless an amount corresponding to 56.8% of the oral amoxicillin ingested by the volunteer was determined in the urine sample collected 7 h after the oral administration of the drug. These results are in accordance with the fact that 60% of the oral ingestion of amoxicillin is excreted by urine in a period of 6–8 h [39]. Fig. 4 shows obtained chromatograms corresponding to blank human urine (a), a human urine sample spiked at a concentration level of 2 mg L<sup>-1</sup> (b) and a human urine sample collected 7 h after an oral administration of 750 mg of amoxicillin. It is noticeable that good base lines and adequate peaks were obtained for all the analyzed samples. Therefore, according to the obtained results, it can be assessed that the proposed EME procedure is adequate for the extraction of the target analytes in human urine samples.

## 4. Conclusions

Tiss®-OH nanofiber membrane has been proposed as support for electromembrane extraction with excellent results for the extraction of highly polar acidic compounds. The proposed EME procedure involves a carrier-mediated mechanism using Aliquat®336 as cationic carrier dissolved in the supported liquid membrane. Recoveries in the 60–85% range were obtained, which leads to consider this new support as a promising material. This paper could be considered as an open door for future uses in the applications of EME for compounds of very different nature.

## Acknowledgements

This work was supported by the Project CTM2015-67902-C-1-P from the “Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional de I+D+i (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain)”.

CRH is grateful to University of Sevilla for personal funding through the V Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla (Grant No. USE-13723-S).

We thank to nanoMyP® for kindly provide us the Tiss®-OH nanofiber membranes, especially to Dr. Antonio Medina Castillo for

his assistance during the course of this research.

## References

- [1] H. Liu, P. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817–1821.
- [2] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240.
- [3] G. Audunsson, Aqueous-aqueous extraction by means of a liquid membrane of sample clean-up and pre-concentration of amines in a flow system, *Anal. Chem.* 58 (1986) 2714–2723.
- [4] E. Thordarson, S. Pálmarasdóttir, L. Mathiasson, A. Jönsson, Sample preparation using a miniaturized supported liquid membrane device connected on-line to packed capillary liquid chromatography, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2559–2563.
- [5] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656.
- [6] M.A. Bello-López, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, Analytical applications of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME): a review, *Anal. Lett.* 45 (2012) 804–830.
- [7] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 183–190.
- [8] Y. Yamini, A. Pourali, S. Seidi, M. Rezazadeh, Electromembrane extraction followed by high performance liquid chromatography: an efficient method for extraction and determination of morphine, oxycodone, and methylmorphine from urine samples, *Anal. Methods* 6 (2014) 5554–5565.
- [9] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of polar basic drugs from plasma with pure bis(2-ethylhexyl) phosphite as supported liquid membrane, *Anal. Chim. Acta* (2016) In press.
- [10] E. Carasek, J. Merib, Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: a review, *Anal. Chim. Acta* 880 (2015) 8–25.
- [11] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction for pharmaceutical and biomedical analysis—Quo vadis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 97–107.
- [12] A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane, extraction-three-phase electrophoresis for the future preparative applications, *Electrophoresis* 35 (2014) 2421–2428.
- [13] C. Basheer, J. Lee, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, H.K. Lee, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs at neutral sample pH: a novel electro-mediated microextraction approach, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6661–6667.
- [14] J. Lee, F. Khalilian, H. Bagheri, H.K. Lee, Optimization of some experimental parameters in the electro membrane extraction of chlorophenols from seawater, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7687–7693.
- [15] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Drop-to-drop microextraction across a supported liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1496–1502.
- [16] L. Xu, P.C. Hauser, H.K. Lee, Electro membrane isolation of nerve agent degradation products across a supported liquid membrane followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 17–22.
- [17] B. Principio del formulario Final del formulario Zargar, H. Parham, A. Hatamie, Hollow fiber liquid based microextraction of nalidixic acid in urine samples using Aliquat 336 as a carrier combined with High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016) 257–263.
- [18] H.Y. Principio del formulario Final del formulario Kim, S.H. Yoon, T.Y. Jeong, S. Yu, S.D. Kim, Determination of conjugated estrogens in human urine using carrier-mediated hollow-fiber liquid phase microextraction and LC-MS/MS, *Desalin. Water Treat.* 57 (34) (2016) 16024–16033.
- [19] Y. Wang, Y. Liu, J. Han, L. Wang, T. Chen, L. Ni, Selective extraction and preconcentration of trace lead(II) in medicinal plant-based ionic liquid hollow fiber liquid phase microextraction system using dicyclohexyl-18-crown-6 as membrane carrier, *Anal. Methods* 7 (2015) 2339–2346.
- [20] K.M. Principio del formulario Final del formulario Ara, Z. Akhoondpouramiri, F. Raofie, Carrier mediated transport solvent bar microextraction for preconcentration and determination of dexamethasone sodium phosphate in biological fluids and bovine milk samples using response surface methodology, *J. Chromatogr. B* 931 (2013) 148–156.
- [21] C. Román-Hidalgo, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, M.J. Martín-Valero, M.A. Bello-López, Agar films containing silver nanoparticles as new support for electromembrane extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1519–1525.
- [22] A.A. Sauve, NAD and vitamin B3: from metabolism to therapies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 (2008) 883–893.
- [23] H. Yuan, J. Wan, L. Li, P. Ge, H. Li, L. Zhang, Therapeutic benefits of the group B3 vitamin nicotinamide in mice with lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis, *Pharmacol. Res.* 65 (2012) 328–337.
- [24] M.S. Goligorsky, Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney disease: a retrospective and what the future may hold, *Kidney Res. Clin. Pract.* 34 (2015) 76–82.
- [25] M. An, Y. Gao, Urinary biomarkers of brain diseases, *Genom. Proteom. Bioinforma.* 13 (2015) 345–354.
- [26] S. Decharat, Hippuric Acid levels in paint workers at steel furniture manufacturers in Thailand, *Saf. Health Work* 5 (2014) 227–233.
- [27] E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto, M. Nishida, Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 261–267.
- [28] A. Aoyama, T. Doi, T. Tagami, K. Kajimura, Simultaneous determination of 11 preservatives in cosmetics by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 1010–1015.
- [29] L.H. Shen, H.N. Wang, P.J. Chen, C.X. Yu, Y.D. Liang, C.X. Zhang, The analytical determination and electrochemiluminescence behavior of amoxicillin, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 199–205.
- [30] T.M. Middlethon-Bruer, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs, *J. Sep. Sci.* 31 (2016) 753–759.
- [31] NanoMyP® TISS SERIES®. (<http://nanomyp.com/en/page.cfm?Id=42&title=tiss-series>). (accessed 02.07.16).
- [32] M. Ramos-Payán, M.A. Bello-López, R. Fernández-Torres, M. Villar-Navarro, M. Callejón Mochón, Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples, *Talanta* 85 (2011) 394–399.
- [33] M. Ramos-Payan, M.A. Bello-López, R. Fernández-Torres, J.L. Pérez-Bernal, M. Callejón-Mochón, HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME), *Anal. Chim. Acta* 653 (2009) 184–190.
- [34] N. Drouin, S. Rudaz, J. Schappler, Dynamic-electromembrane extraction: a technical development for the extraction of neuropeptides, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5308–5315.
- [35] A. Slamková, P. Kubán, P. Bocek, Additional considerations on electrolysis in electromembrane extraction, *J. Chromatogr. A* 1429 (2016) 364–368.
- [36] P. Kubán, P. Bocek, The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extraction: the role of acceptor solution, *J. Chromatogr. A* 1398 (2015) 11–19.
- [37] A. Slamková, P. Kubán, P. Bocek, Quantitative aspects of electrolysis in electromembrane extractions of acidic and basic analytes, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015) 92–100.
- [38] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed., Prentice Hall, London, 2000.
- [39] S.P. Kaur, R. Rao, S. Nanda, Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2011) 30–37.



# Use of Polymer Inclusion Membranes (PIMs) as support for electromembrane extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and highly polar acidic drugs



Román-Hidalgo Cristina<sup>a</sup>, Martín-Valero María Jesús<sup>a,\*</sup>, Fernández-Torres Rut<sup>a,b</sup>, Bello-López Miguel Ángel<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Sevilla, c/Prof. García González, s/n, 41012 Sevilla, Spain

<sup>b</sup> Research Centre of Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Polymer inclusion membranes  
PIM  
Electromembrane extraction  
Non-steroidal anti-inflammatory drugs  
Polar drugs

## ABSTRACT

The use of polymer inclusion membranes (PIMs) as support of 1-octanol liquid membrane in electromembrane extraction (EME) procedure is proposed. Synthesis of PIMs were optimized to a composition of 29% (w/w) of cellulose triacetate as base polymer and 71% (w/w) of Aliquat®336 as cationic carrier. Flat PIMs of 25 μm thickness and 6 mm diameter were used. EME protocol was implemented for the simultaneous extraction of four non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (salicylic acid, ketoprofen, naproxen and ibuprofen) and four highly polar acidic drugs (anthranilic acid, nicotinic acid, amoxicillin and hippuric acid). Posterior HPLC separation of the extracted analytes was developed with diode array detection. Recoveries in the 81–34% range were obtained. EME procedure was applied to human urine samples.

## 1. Introduction

Polymer Inclusion Membranes (PIMs) are homogeneous, self-supporting membranes usually composed of an extractant (carrier), a base polymer, commonly polyvinyl chloride (PVC) or cellulose triacetate (CTA), and a plasticizer or modifier. The mechanical strength of the membrane, as well as its diffusive resistance, is provided by the base polymer. The carrier is essentially an ion-exchanger or a complexing agent, which binds with the species of interest, transporting them across the PIM. The concentration gradient of the species/carrier complex or ion-pairs formed within the membrane is the responsible of the species transportation through the membrane. Plasticizer, not only provides the membrane with elasticity and flexibility, but also acts as solvent. The presence of plasticizer also improves the compatibility of the membrane components [1,2]. Carrier also acts as a plasticizer in some cases, so an additional plasticizer is not necessary. Another component (a modifier) can be occasionally added to the PIM composition in order to improve the solubility of the extracted species in the membrane liquid phase.

Polymer-based membranes have been used since long ago as an important alternative to traditional solvent extraction, however, in the last years their applications have been focused on chemical sensing, acting as ion-selective electrodes (ISEs) [3]. Composition of PIMs is

essential on their physical and chemical properties as well as on membrane selectivity. Several researchers have been studying the transport efficiency through PIMs. It is known that the nature and components of PIMs improve the transport of the target species through the membrane, making it faster [4]. Another advantage of these kinds of membranes is that the entire membrane is available for ion transport. These characteristics, between others (easy operation, minimum use of hazardous chemicals, flexibility) make PIMs more advantageous membranes compared with the traditional supports for liquid membranes (SLM). Consequently, in the literature several researches about the use of PIMs as alternative membranes in electro-membrane extraction (EME) can be found. It has been probed their efficiency for the extraction of inorganic and organic anions (propanesulfonate, heptanesulfonate, decanesulfonate, tetraethylammonium, tetra-butylammonium and tetrapentylammonium) [4–8].

In the last years, some technical developments in EME have been published [9]. Within this realm, new supports for liquid membranes in EME procedures have also been proposed and implemented as available and advantageous alternatives to traditional polypropylene supports: carbon nanotubes [10,11], hollow polymer inclusion membranes [12] or nanostructured supports of diverse nature [13,14]. Our research group has recently been investigating in the development of new nanostructured supports for EME as real and promising alternatives to

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [mmartin@us.es](mailto:mmartin@us.es) (M.-V. María Jesús), [mabello@us.es](mailto:mabello@us.es) (B.-L. Miguel Ángel).

polypropylene hollow fibers or flat membranes.

Román-Hidalgo et al. [13] proposed agarose films containing silver nanoparticles as new supports for EME of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). In this research, the new support acts as active part in the extraction process of the analytes.

Another new support was proposed by researchers belonging to our group [14] for carrier-mediated electromembrane extraction of highly acidic polar compounds (nicotinic acid, amoxicillin, hippuric acid and salicylic acid). In this case, the new support for SLM in EME consisted of an acrylic nanofiber membrane sheet (100  $\mu\text{m}$  thickness) containing high density of –OH groups.

In the present work, the use of PIMs as support for EME is proposed for the simultaneous extraction of four NSAIDs (salicylic acid (SAC), ketoprofen (KTP), naproxen (NAX) and ibuprofen (IBU)) and four acidic polar drugs (hippuric acid (HIP), anthranilic acid (ANT), amoxicillin (AMX) and nicotinic acid (NIC)). 1-octanol as SLM is supported in a synthesized homogeneous flat sheet PIM of CTA in DCM with Aliquat®336 as cationic carrier. EME is carried out in a self-made device using HPLC for the determination of the target analytes.

The four selected NSAIDs belong to a wide group of compounds known due to their anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties. These drugs work by blocking cyclo-oxygenase (COX) enzymes, though NSAIDs can have different chemical structures [15]. On the other hand, among the acidic polar drugs, HIP is one of the major urinary endogenous metabolites on humans, population submitted to toluene intoxication [16] or with renal failures [17] can show high concentrations of this compound in urine. NIC, which is the common form of the B3-vitamin being one of the essential human vitamins [18]. ANT is an intermediate in the metabolism of tryptophan, being endogenous in humans [19].

EME procedures for the extraction of NSAIDs, as well as for acid and basic drugs, have been developed using different supports for SLM (agarose films containing silver nanoparticles, nanofiber membranes or decorated hollow fibers, among others) [13,14,20]. Nevertheless, to our knowledge it is the first time that simultaneous extraction of high polar drugs together with NSAIDs using EME has been done. This is a noticeable advantage of the proposed protocol due to the different characteristics and properties of the selected molecules. Good recoveries (%) are obtained for all the extracted compounds. Besides, the method has been successfully applied to the determination of the target analytes in human urine samples.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were of analytical grade. Hippuric acid (HIP) and anthranilic acid (ANT) were obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Amoxicillin (AMX), nicotinic acid (NIC), salicylic acid (SAL), 1-octanol, dihexyl ether, cellulose triacetate (CTA), nitro-phenyl-octyl-ether (NPOE) and Aliquat®336 were obtained from Fluka-Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Ketoprofen (KTP), naproxen (NAX), ibuprofen (IBU), sodium hydroxide, hydrochloric acid, acetic acid, sodium acetate, sodium dihydrogen phosphate, ammonia, dichloromethane, methanol, ammonium chloride and tris(2-ethylhexyl) phosphate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). 2-ethylnitrobenzene and heptanol were obtained from VWR (Darmstadt, Germany). Dimethylformamide (DMF) was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Ultrapure water from Milli-Q Plus water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA) was used for preparing all solutions and dilutions. Working solutions were daily prepared by adequate dilutions from aqueous solutions (400  $\text{mg L}^{-1}$ ) of NIC, AMX, HIP and ANT. In the case of SAL, KTP, NAX and IBU, dilutions were prepared from methanolic 400  $\text{mg L}^{-1}$  solutions.

### 2.2. PIMs preparation

The preparation of the flat sheet membrane was based on the protocol proposed by See et al. with several modifications [5,6]. The synthesis was as follows: 0.6 g of cellulose triacetate (CTA) was added to 30 mL of dichloromethane, the mixture was placed in an ultrasonic bath till complete solution. On the other hand, the amount of Aliquat®336 corresponding to a 5% (w/v) in the final mixture was weighted and added to the CTA solution. After homogenization, 2.5 mL of the resulting mixture were poured onto a glass (90 mm diameter) Petri dish and dichloromethane was allowed to evaporate slowly at room temperature. Once the solvent was completely evaporated, membranes (25  $\mu\text{m}$  thickness), containing 29% (w/w) CTA and 71% (w/w) Aliquat®336, can be peel off the dishes.

### 2.3. EME proposed procedure

EME procedure for the extraction of the selected analytes was developed according to a home-made device previously designed in our laboratory for carrier-mediated EME of polar compounds using nanostructured supports for SLM [13]. In this case, the synthesized PIM described above has been used as support. 10 mL (pH 4) of donor phase containing the target analytes in a concentration of 1  $\text{mg L}^{-1}$  was placed in a 25 mL glass vial. The compartment used for acceptor solution was a screw plug 2 mL 2-SV glass micro vial (Chromacol, Welwyn Garden City, UK). Previously, the bottom of this micro vial was cut, placing the PIM in the micro vial plug and screwing it in order to seal the compartment by pressure. The micro vial, sealed with the plug (containing the PIM) was soaked in the organic solvent (1-octanol). Now, the micro vial was put upside down in order to fill it with 300  $\mu\text{L}$  of acceptor phase (300  $\mu\text{L}$ , pH 10). Platinum electrodes (0.25 mm diameter) ending in spiral shape were placed into both, acceptor and donor phases. Both electrodes were connected to a Power Source 300 V DC power supply (VWR International, West Chester, Pennsylvania, USA) with programmable voltage in the range 2–300 V, providing currents in the range 4–500 mA. The described device can be seen in Fig. 1.

50 V was applied during 30 min with the donor phase stirring at 300 rpm. The average current registered during the extraction time was in the range 100–1000  $\mu\text{A}$ . Once EME was carried out, 20  $\mu\text{L}$  of the acceptor phase were collected with a microsyringe and injected in the HPLC system.

### 2.4. Chromatographic conditions

A LabChrom® VWR-Hitachi (Barcelona, Spain) liquid chromatograph was used for the HPLC separation of the analytes. The system was equipped with a quaternary L-7100 pump and a L-7455 diode array detector (DAD). A L-2200 autosampler was used for the injection of the samples (20  $\mu\text{L}$ ). A LiChroCART® 75-4 Purosphere® STAR RP-18e 3  $\mu\text{m}$  (75 mm  $\times$  4.0 mm i.d) (VWR, Darmstadt, Germany) column, with a Kromasil® 100 Å, C18, 5  $\mu\text{m}$  (15 mm  $\times$  4.6 mm i.d.) (Scharlab S.L., Barcelona, Spain) guard column, was used for the chromatographic separation. Column was thermostated at 20 °C during the separation time.

Gradient elution was used at a flow rate of 0.8  $\text{mL min}^{-1}$ , using as mobile phase 0.05% aqueous formic acid (component A) and acetonitrile (component B). Initial conditions are 99% (v/v) A, decreasing to 90% in 3 min, maintaining this rate 1 min, then the rate decrease to 60% in 0.1 min, maintaining it for 12 min. Finally, %B (v/v) increases till 100% in 7 min. The monitoring wavelengths for DAD detection were 260 nm for NIC, 230 nm for AMX, 235 nm for HIP, 224 nm for ANT, 235 nm for SAL, 255 nm for KTP, 230 nm for NAX and 224 nm for IBU, respectively.



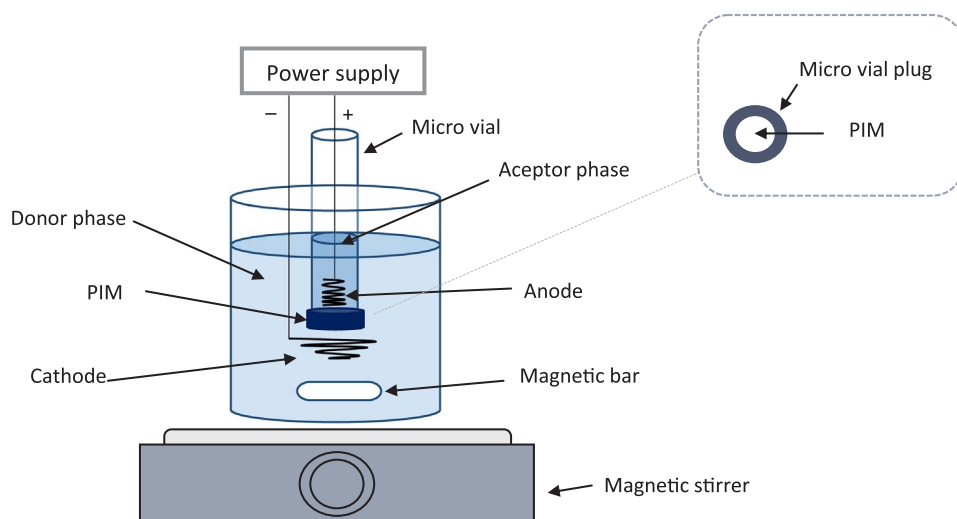


Fig. 1. Schematic illustration of the experimental device for EME procedure.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Preliminary assays

All the preliminary EME assays were carried out using 10 mL of a standard aqueous solution containing the target compounds ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) as donor phase and 300  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution as acceptor phase.

##### 3.1.1. Optimization of the PIM synthesis

As it was mentioned in Section 2.2., PIM was synthesized dissolving a certain amount of CTA in DCM and mixing this solution with Aliquat®336. According to the literature, plasticizer or modifier can also be present in the membrane [1,2]. Consequently, preliminary assays were carried out in order to synthesize a PIM with optimal properties as support of SLM in EME purposes. Different amounts of CTA (75–600 mg) were dissolved in variable volumes (20–30 mL) of DCM. In order to get the better physical properties of the resulting PIM, in terms of thickness and flexibility, as well as for obtaining better recoveries of the selected analytes, the optimal proportion for this solution was 600 mg of CTA dissolved in 30 mL of DCM.

Besides, different proportions of tris(2-ethylhexyl)phosphate (TEHP) as plasticizer (0%, 2.5%, 5% and 10% (w/v)) were tested. The presence of plasticizer conditioned the elasticity of the membrane as well as its consistence. When plasticizer was added to PIM, the resulting membrane had a poor consistence. Thus, this component was not used in the membrane synthesis.

The presence of different amounts of carrier in the composition of the PIM was also tested. The proportion of carrier in the membrane was an important fact, especially due to the role that this component plays in the carrier-mediated EME procedure of the target analytes. Therefore, the presence of Aliquat®336, as cationic carrier, in the composition of PIM was studied. Different proportions (0%, 1%, 2.5%, 5%, 7% and 10% (w/v)) of this carrier in solution were checked. Due to the chemical structure of the analytes, the presence in the membrane of Aliquat, favors the carrier-mediated extraction of the compounds. When the proportion of Aliquat was lower than 5%, obtained recoveries were poor (10–15%, for all the compounds). For 5% Aliquat, recoveries ranging 34–81% were obtained. Nevertheless, for higher proportions of Aliquat (> 5%), the obtained recoveries ranged between 10–35%. Thus 5% (w/v) of Aliquat®336 in PIM led to better yield in terms of extraction.

Once the proportions of CTA and Aliquat®336 were optimized, the synthesis of the polymer inclusion membrane was set by dissolving 0.6 g of CTA in 30 mL of DCM, once homogeneous, the amount of Aliquat®336 corresponding to a 5% (w/v) was weighted and added to

the CTA solution till homogeneous mixture.

Finally, in order to synthesize membranes of different thickness, variable volumes (2.5, 5 and 10 mL) of the homogeneous mixture were poured out into Petri dishes. After complete evaporation of the solvent, membranes of 25–80  $\mu\text{m}$  thickness were respectively obtained. A Zeiss Auriga Scanning Electron Microscopy (SEM) was used in order to get the exact thickness of the resulting PIMs. Thickness of 25.6–27.4, 49.5–51.0 and 79.6–81.0  $\mu\text{m}$  were respectively measured in each of the synthesized PIMs. After applying the EME procedure using PIMs of the three thicknesses, it was checked that thicker PIMs only led to poor recoveries ranging 2–10% for all the compounds. Nevertheless, thinner PIMs were those that led to better extraction recoveries for all the target analytes. When analytes have to cross a thinner support, the extraction and thus, obtained recoveries are better. Therefore, once the solvent was completely evaporated, the optimal PIM composition in terms of recoveries was 29% (w/w) CTA and 71% (w/w) Aliquat®336. Fig. 2 shows the SEM image corresponding to the thinner PIM.

##### 3.1.2. Organic solvent as SLM

Different organic solvents were tested as SLM: 1-octanol, dihexyl ether, 2-ethylnitrobenzene, heptanol, nitrophenyl-octyl ether (NPOE) and dimethylformamide (DMF). DMF was rejected due to the fact that PIM nature was affected by this solvent. No appreciable differences, in terms of enrichment factors, were obtained for the rest of solvents. Consequently, 1-octanol was selected as SLM according to the good results, in terms of enrichment factors, achieved in previous EME procedures carried out in our group [12,13,21].

#### 3.2. Influence of pH of donor and acceptor phases

According to previous studies, pH of both acceptor and donor phases is one of the experimental parameters that should be controlled due to its importance in EME performance. Slampová et al. established quantitative aspects of electrolysis in electromembrane extractions [22,23]. Kubán et al. also contributed to this aspect with some important considerations on pH control of acceptor solution during EME process [24]. Besides, during the time of extraction, the presence of electrolytic generated  $\text{OH}^-$  and  $\text{H}^+$  affects pH of acceptor and donor phases. This fact is highly dependent on applied voltage, time of extraction and nature of the compounds that migrate in EME procedure. Therefore, pH control should be done in order to implement the extraction yield.

Consequently, several EME experiences were carried out controlling pH of both, acceptor and donor phases. These experiments were done during 10 min and applying 50 V. Five different pH values in the

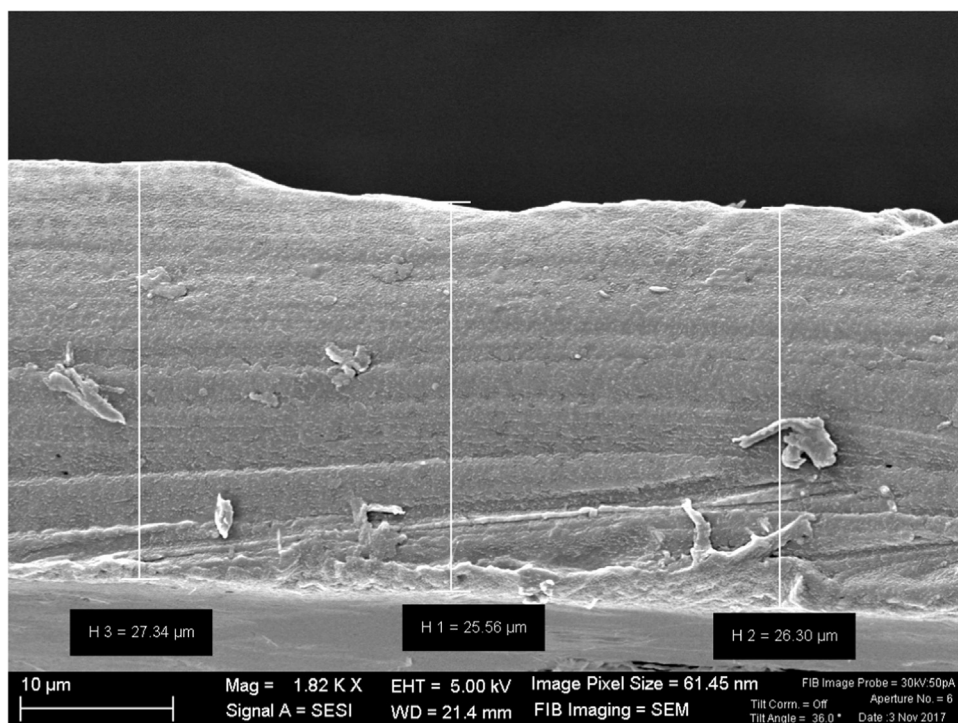


Fig. 2. SEM image of a section of the thinner PIM.

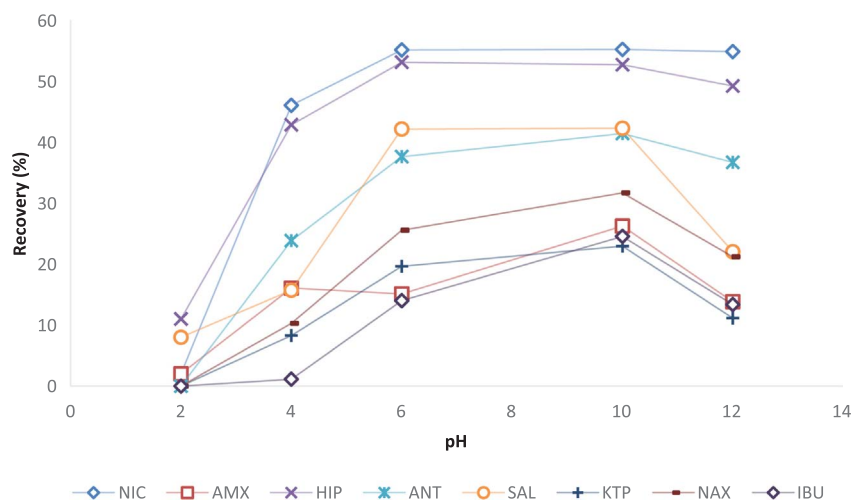


Fig. 3. Influence of the acceptor phase pH.

acceptor phase were tested: 2, 4, 6, 10 and 12. Acetic acid solution (5.69 M) was used for achieving pH 2. 100 mM acetate/acetic buffer was used for adjusting pH 4 and pH 6. pH 10 was adjusted using a 100 mM ammonium chloride/ammonia buffer and pH 12 was achieved with ammonia solution (100 mM). When EME procedure was carried out at pH 2, very low recoveries were obtained for all the compounds. Fig. 3 shows the recoveries obtained for the extractions developed for the rest of pH values. As it can be seen, recoveries increase with pH value reaching a maximum at pH 10 for most of analytes, decreasing the recoveries for higher pH. This fact can be explained according to the  $pK_a$  values of the compounds. NSAIDs are mostly in ionic form from pH 5. High polar drugs are also in ionic form at higher pH values, which favors their extraction as ion pair. Thus, pH 10 was the optimal value selected for pH of the acceptor phase.

In the same way, pH value of the donor phase was optimized. In all cases, pH of the acceptor phase was adjusted at pH 10 using a 100 mM ammonium chloride/ammonia buffer. Different values of pH (4, 6 and 10) for donor solution were tested. In the case of pH 4, this was the resulting pH of the analytes solution. For adjusting pH 6 and pH 10,

buffers mentioned above were also used. When EME was carried out using pH 6 and 10 in donor phase, neither volume nor pH value kept constant during the extraction procedure. Therefore, pH 4 was set at the optimal pH value for donor phase.

### 3.3. Optimization of applied voltage and time of extraction

Once implemented pH values of acceptor (pH 10) and donor phase (pH 4), another experimental variable that was optimized was the applied voltage during EME procedure. Voltages in the range 10–100 V were tested. All the experiments were carried out adjusting pH 10 for acceptor phase and pH 4 for donor phase. In Fig. 4, the obtained recoveries for all the target analytes are depicted at the different applied voltages. It is noticeable that recoveries increased with the applied voltage from 10 V to 50 V. From this voltage, recoveries decrease slightly or keep their values constant till 100 V. Accordingly, 50 V was selected as applied voltage during EME process.

In order to optimize the time of extraction, EME was carried out during 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 min, respectively. In all the

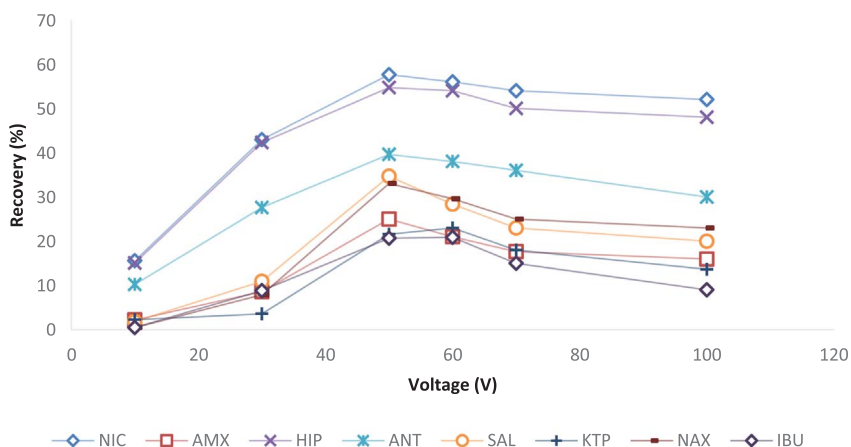


Fig. 4. Influence of the applied voltage.

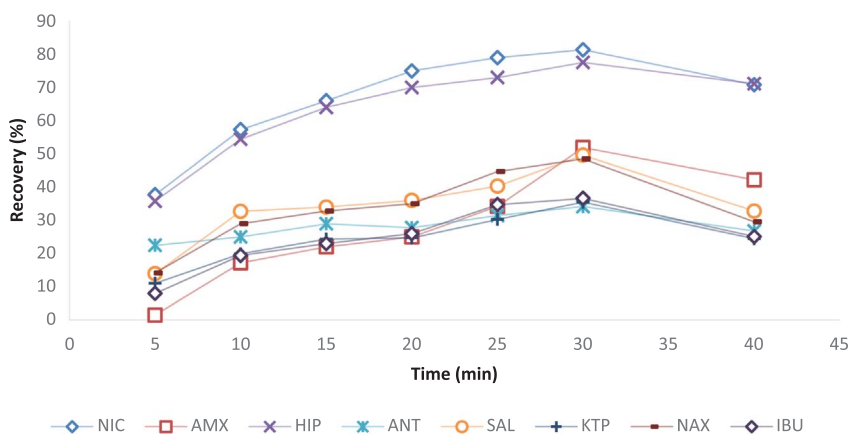


Fig. 5. Influence of time of extraction.

**Table 1**  
Calibration data, Limits of Detection (LOD) and Quantitation (LOQ) and recoveries for the target analytes in human urine.

Analyte	Linear range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Linearity (%)	Linearity ( $R^2$ )	LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recovery (%)
NIC	96–500	97.0	0.995	29.0	96.0	81
AMX	333–500	96.9	0.993	100.0	333.0	52
HIP	71–500	97.8	0.997	21.0	71.0	78
ANT	207–500	97.1	0.997	62.0	207.0	34
SAL	61–500	98.0	0.998	18.0	61.0	50
KTP	131–500	96.0	0.993	39.0	131.0	35
NAX	124–500	96.6	0.998	37.0	124.0	48
IBU	62–500	97.7	0.998	19.0	62.0	37

<sup>a</sup> LOD and LOQ according to the effective recoveries.

extractions the applied voltage was 50 V. Obtained results, in terms of recoveries (%), can be seen in Fig. 5. In the range 5–10 min, recoveries of all the analytes increased. In the range 10–30 min, there is variability in the obtained recoveries, though the values of recoveries increased for all the analytes. For times of extraction higher than 30 min, recoveries decreased in all cases. Thus, 30 min was the selected time for developing EME procedure.

### 3.4. Influence of acceptor/donor phases volume

Volume ratio of acceptor/donor solutions was also optimized. Due to the design of the device in which EME was carried out, volumes higher than 300  $\mu\text{L}$  of acceptor phase were not available. Thus, different volumes of donor solution were studied. 5, 10, 15 and 20 mL were tested. Better results in EME were obtained using 10 mL.

Consequently, after implementing all the experimental variables described above, EME process was carried out as described in Section 2.3.

### 3.5. Validation of the EME procedure

After carrying out EME procedure according to the optimal experimental conditions, the obtained recoveries for the target analytes were: 81% for NIC, 52% for AMX, 78% for HIP, 34% for ANT, 50% for SAL, 35% for KTP, 48% for NAX and 37% for IBU, respectively. Thus, PIMs can be successfully used as support for simultaneous electro-membrane extraction of NSAIDs and acidic polar drugs.

A validation process was carried out in order to confirm the suitability of the proposed EME procedure. As quality parameters, linearity, sensitivity, precision and recovery were studied.

Matrix effect due to the presence of urine samples was observed, thus standard addition was used for the calibration. In Table 1, calibration data of the chromatographic method can be seen. Also, linear range as well as limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) are depicted for all the target analytes, according to the effective recovery. The criteria used for LOD and LOQ calculation was the signal to noise ratio (3 for LOD and 10 for LOQ, respectively) [25]. Good linearity is obtained for all the studied compounds, ranging the linearity (%) between 96.0 for KTP and 98.0 for SAL. Values ranging between 18.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  for SAL and 100.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  for AMX were obtained for LODs. LOQs range between 61.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  for SAL and 333.3  $\mu\text{g L}^{-1}$  for AMX.

The EME proposed method was applied to urine samples in order to evaluate the repeatability and intermediate precision. Measurements were done in one single day and two days per week during three weeks, respectively. The obtained values for %RSD were 1–8% for repeatability and 2–12% for intermediate precision, respectively.

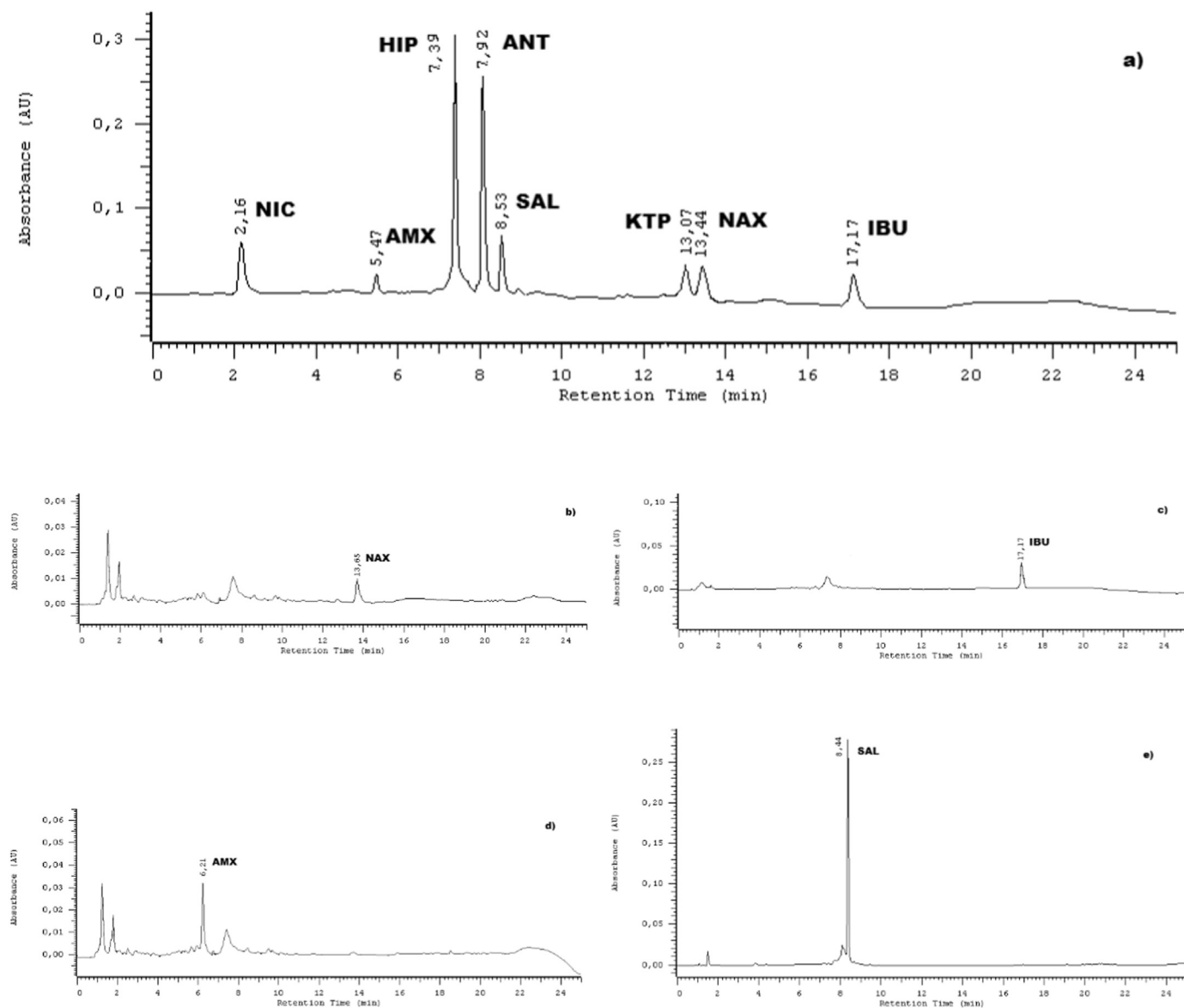


Fig. 6. HPLC chromatograms of human urine samples submitted to the EME procedure. (a) human urine sample spiked at  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ; (b) human urine sample collected 3 h after an oral administration of 550 mg of naproxen; (c) human urine sample collected 7 h after an oral administration of 600 mg of ibuprofen (d) human urine sample collected 7 h after an oral administration of 750 mg of amoxicillin (e) human urine sample collected 4 h after an oral administration of 500 mg of acetylsalicylic acid.

Table 2

Application of EME proposed procedure to real human urine samples.

Analyte	Ingested doses (mg)	Excretion time	Concentration in urine <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )
AMX	750	7	165
IBU	600	7	259
NAX	550	3	319
SAL	500 <sup>b</sup>	4	711

<sup>a</sup> RSD < 7%.

<sup>b</sup> As acetylsalicylic acid.

After the validation study, it can be assessed that the use of PIMs as support for SLM is adequate for the simultaneous electromembrane extraction of NSAIDs and highly polar drugs.

### 3.6. Application to real samples

In order to study the application of the EME proposed protocol to

real samples, NAX, AMX, IBU and SAL were selected for being determined in human urine samples. These four drugs are the active ingredient of tablets (containing different doses), which can be easily acquired by population in chemists'.

According to the literature, 60% of the oral ingestion of AMX is excreted by urine in a period of 6–8 h [26]. In the case of NAX, 95% approximately of this drug (from any dose) is excreted in the urine, being 66–92% as conjugates, < 1% as 6-O-desmethyl-naproxen and < 1% as NAX [27]. The usual dosage of IBU, supplied as tablets, is 400–800 mg three times a day. This drug is completely eliminated in 24 h after the last dose. In a period of 6–8 h after the ingestion approximately 10% is excreted by urine. More than 90% of an ingested dose of IBU is excreted in the urine as metabolites or their conjugates, being the major metabolites hydroxylated and carboxylated compounds [28,29]. On the other hand, after administration of acetylsalicylic acid (ASA), SAL is generated by hydrolysis [30]. Usual SAL urine levels are in the hundreds of  $\mu\text{g mL}^{-1}$  range [31].

Therefore, human urine collected from healthy volunteers after the administration of different oral doses of NAX, AMX, ASA and IBU were

microfiltered (0.22  $\mu\text{m}$ ), diluted with ultrapure water (1:500, v/v) and submitted to the EME procedure. Fig. 6 shows the chromatograms corresponding to (a) human urine sample spiked at 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; (b) human urine sample collected 3 h after an oral administration of 550 mg of naproxen; (c) human urine sample collected 7 h after an oral administration of 600 mg of ibuprofen (d) human urine sample collected 7 h after an oral administration of 750 mg of amoxicillin; (e) human urine sample collected 4 h after an oral administration of 500 mg of acetylsalicylic acid. All chromatograms show good baselines and well-defined peaks for the target analytes.

Once carried out the EME procedure in the human urine samples, the obtained results can be seen in Table 2. Taking into account the collected volume of urine as well as the effective recovery of the EME procedure (Table 2) for each of the analyzed drugs, the concentrations found for NAX, AMX, IBU and SAL in human urine samples are in accordance with the usual excreted amounts according to the literature data.

Although urine samples containing HIP, ANT, KTP and NIC were not available for the analysis, LOQ values of the proposed EME method are much lower than the usual values for these compounds in human urine samples. According to the literature, levels of approximately 5  $\text{mg L}^{-1}$  for ANT, 160  $\text{mg L}^{-1}$  for KTP and 300–500  $\text{mg L}^{-1}$  for HIP and NIC have been found in human urine samples [32–35]. Therefore, it can be assessed that the proposed EME method could be applied for determining these analytes in real urine samples.

#### 4. Conclusions

Polymer inclusion membranes of 25  $\mu\text{m}$  thickness have been successfully used as support for electromembrane extraction. The composition of PIMs was 29% (w/w) of cellulose triacetate as base polymer and 71% (w/w) of Aliquat®336 as cationic carrier. NSAIDs and highly polar acidic drugs were simultaneously extracted, obtaining recoveries ranging between 81% and 34%. The application of the proposed EME procedure has been assessed for determining the target analytes in human urine samples, thus, PIMs seem to be a good alternative to traditional flat supports for EME.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Project CTM2015-67902-C-1-P from the “Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional de I + D + i (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain)”.

CRH is grateful to University of Sevilla for personal funding through the V Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

#### References

- [1] M.I. Vázquez, V. Romero, C. Fontàs, E. Anticó, J. Benavente, Polymer inclusion membranes (PIMs) with the ionic liquid (IL) Aliquat 336 as extractant: effect of base polymer and IL concentration on their physical-chemical and elastic characteristics, *J. Membr. Sci.* 455 (2014) 312–319.
- [2] M.I.G.S. Almeida, R.W. Cattrall, S.D. Kolev, Recent trends in extraction and transport of metal ions using polymer inclusion membranes (PIMs), *J. Membr. Sci.* 415–416 (2012) 9–23.
- [3] R.W. Cattrall, Chemical sensors, in: R.G. Compton (Ed.), *Oxford Chemistry Primers*, 52 Oxford University Press, New York, 1997.
- [4] H.H. See, P.C. Hauser, Electro-driven extraction of low levels of lipophilic organic anions and cations across plasticized cellulose triacetate membranes: effect of the membrane composition, *J. Membr. Sci.* 450 (2014) 147–152.
- [5] H.H. See, P.C. Hauser, Automated electric-field-driven membrane extraction system coupled to liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8665–8670.
- [6] H.H. See, P.C. Hauser, Electric field-driven extraction of lipophilic anions across a carrier-mediated polymer inclusion membrane, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7507–7513.
- [7] H.H. See, S. Stratz, P.C. Hauser, Electro-driven extraction across a polymer inclusion membrane in a flow-through cell, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 79–84.
- [8] J. Schimdt-Marzinkowski, H.H. See, P.C. Hauser, Electric field driven extraction of inorganic anions across a polymer inclusion membrane, *Electroanalysis* 25 (2013) 1879–1886.
- [9] A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Recent developments in electromembrane extraction, *Anal. Methods* 5 (2013) 4549–4557.
- [10] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, H. Ahmar, A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine, breast milk and wastewater samples, *J. Chromatogr. A* 1285 (2013) 1–6.
- [11] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, Development and application of carbon nanotubes assisted electromembrane extraction (CNTs/EME) for the determination of buprenorphine as a model of basic drugs from urine samples, *Anal. Chim. Acta* 767 (2013) 75–80.
- [12] N.A. Mamat, H.H. See, Development and evaluation of electromembrane extraction across a hollow polymer inclusion membrane, *J. Chromatogr. A* 1406 (2015) 34–39.
- [13] C. Román-Hidalgo, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, M.J. Martín-Valero, M.A. Bello-López, Agar films containing silver nanoparticles as new support for electromembrane extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1519–1525.
- [14] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín-Valero, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, M.A. Bello-López, New nanostructured support for carrier-mediated electromembrane extraction of high polar compounds, *Talanta* 162 (2017) 32–37.
- [15] A.S. Michaelidou, D. Hadjipavliou-Litina, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs): a Comparative QSAR Study, *Chem. Rev.* 105 (2005) 3235–3271.
- [16] S. Decharat, Hippuric Acid levels in paint workers at steel furniture manufacturers in Thailand, *Saf. Health Work* 5 (2014) 227–233.
- [17] M. An, Y. Gao, Urinary biomarkers of brain diseases, *Genom. Proteom. Bioinforma.* 13 (2015) 345–354.
- [18] H. Yuan, J. Wan, L. Li, P. Ge, H. Li, L. Zhang, Therapeutic benefits of the group B3 vitamin nicotinamide in mice with lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis, *Pharmacol. Res.* 65 (2012) 328–337.
- [19] Safety evaluation of certain food additives. World Health Organization, Geneva, 2006.
- [20] M. Ramos Payán, R. Fernández Torres, J.L. Pérez-Bernal, M. Callejón Mochón, M.A. Bello López, A novel approach for electromembrane extraction based on the use of silver nanometallic-decorated hollow fibers, *Anal. Chim. Acta* 849 (2014) 7–11.
- [21] M. Ramos Payán, M.A. Bello López, R.M. Fernández Torres, M. Villar Navarro, M. Callejón Mochón, electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples, *Talanta* 85 (2011) 394–399.
- [22] A. Slampová, P. Kubán, P. Bocek, Quantitative aspects of electrolysis in electromembrane extractions of acidic and basic analytes, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015) 92–100.
- [23] A. Slampová, P. Kubán, P. Bocek, Additional considerations on electrolysis in electromembrane extraction, *J. Chromatogr. A* 1429 (2016) 364–368.
- [24] P. Kubán, P. Bocek, The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extraction: the role of acceptor solution, *J. Chromatogr. A* 1398 (2015) 11–19.
- [25] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed., Prentice Hall, London, 2000.
- [26] S.P. Kaur, R. Rao, S. Nanda, Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2011) 30–37.
- [27] R. Runkel, M. Chaplin, G. Boost, E. Segre, E. Forchiell, Absorption, distribution, metabolism and excretion of naproxen in various laboratory animals and human subjects, *J. Pharm. Sci.* 61 (1972) 703–708.
- [28] E.J. Antal, C.E. Wright, B.L. Brown, K.S. Albert, L.C. Aman, N.W. Levin, The influence of hemodialysis on the pharmacokinetics of ibuprofen and its major metabolites, *J. Clin. Pharmacol.* 26 (3) (1986) 184–190.
- [29] B.G. Katzung, D.E. Furst, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics, drugs used in gout, in: *Basic and clinical pharmacology*, 7th Ed., Appliton and Lang Stamford, Connecticut, 1998.
- [30] B.E. Cham, J.H.M. Dykman, F. Bochner, Urinary excretion of aspirin, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 14 (1982) 562–564.
- [31] A.P. Pagani, G.A. Ibañez, Second-order multivariate models for the processing of standard-addition synchronous fluorescence-pH data. Application to the analysis of salicylic acid and its major metabolite in human urine, *Talanta* 122 (2014) 1–7.
- [32] M.A. Crawford, L.L. Hansen, A. Lopez, The excretion of 3-hydroxyanthranilic and quinolinic acid in Uganda Africans, *Br. J. Cancer* 23 (3) (1969) 644–654.
- [33] M.E.P.B. Siqueira, M.J.N. Paiva, Hippuric acid in urine: reference values, *Rev. Saúde Pública* 36 (6) (2002) 723–727.
- [34] D. Strohm, A. Bechthold, N. Isik, E. Leschik-Bonnet, H. Hesecker, Revised reference values for the intake of thiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2) and niacin, *NFS J.* 3 (2016) 20–24.
- [35] T. Ishizaki, T. Sasaki, T. Suganuma, Y. Horai, K. Chiba, M. Watanabe, W. Asuke, H. Hoshi, Pharmacokinetics of ketoprofen following single oral, intramuscular and rectal doses and after repeated oral administration, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 18 (1980) 407–414.

Manuscript Number: TAL-D-18-02998

Title: Chitosan tailor-made membranes as biopolymeric support for electromembrane extraction

Article Type: Research Paper

Keywords: chitosan; polymeric support; electromembrane extraction; pharmaceutical compounds

Corresponding Author: Dr. Martin Valero, PhD

Corresponding Author's Institution: Faculty of Chemistry

First Author: Cristina Roman Hidalgo

Order of Authors: Cristina Roman Hidalgo; German Lopez Perez; Martin Valero, PhD; Miguel Angel Bello Lopez

Abstract: A chitosan membrane composed by 60% (w/w) chitosan and 40% (w/w) Aliquat®336 has been proposed as new biopolymeric support for electromembrane extraction. The new support has been characterized by scan electronic microscopy, being 30-35  $\mu\text{m}$  thickness. Different pharmacological compounds as non steroidal anti-inflammatory drugs as well as polar acidic drugs (amoxicillin, nicotinic acid, hippuric acid, salicylic acid, anthranilic acid, ketoprofen, naproxen and ibuprofen) have been successfully extracted using the proposed support. High enrichment factors have been obtained. The target analytes have been satisfactorily extracted from human urine samples applying the proposed electromembrane extraction procedure. The chitosan membrane seems to be a promise alternative to classical supports for supported liquid membrane.

Opposed Reviewers:



**Dr. M<sup>a</sup> Jesús Martín Valero**

Department of Analytical Chemistry  
Faculty of Chemistry (University of Seville)  
c/ Prof. García González, s/n E-41012-Seville (SPAIN)  
Phone: (+) 34 954556308  
Fax: (+) 34 954557168  
e-mail: mmartin@us.es

Seville, September 13, 2018

Dear Prof. Kauffmann,

Please find enclosed the manuscript "**Chitosan tailor-made membranes as biopolymeric support for electromembrane extraction**" by the authors Román-Hidalgo, Cristina; López-Pérez, Germán; Martín-Valero, María Jesús; Bello-López, Miguel Ángel, for its consideration to be published in *Talanta*.

This manuscript proposes the use of a tailor-made chitosan membrane as new support for electromembrane extraction. The chitosan membrane of 30-35  $\mu\text{m}$  thickness is composed by 60% (w/w) chitosan and 40% (w/w) Aliquat® @336.

The proposed support has been used in the electromembrane extraction of amoxicillin, nicotinic acid, hippuric acid, salicylic acid, anthranilic acid, ketoprofen, naproxen and ibuprofen obtaining high enrichment factors. Besides, the extraction procedure using the new support has been successfully applied to the extraction of the target analytes in human urine samples.

Chitosan membranes become alternative and tailor-made biopolymeric supports with respect to the classical ones polypropylene ones for the electromembrane extraction of different pharmacological compounds.

Thank you for your consideration,

Yours sincerely,

M.J.Martín

### **Novelty Statement**

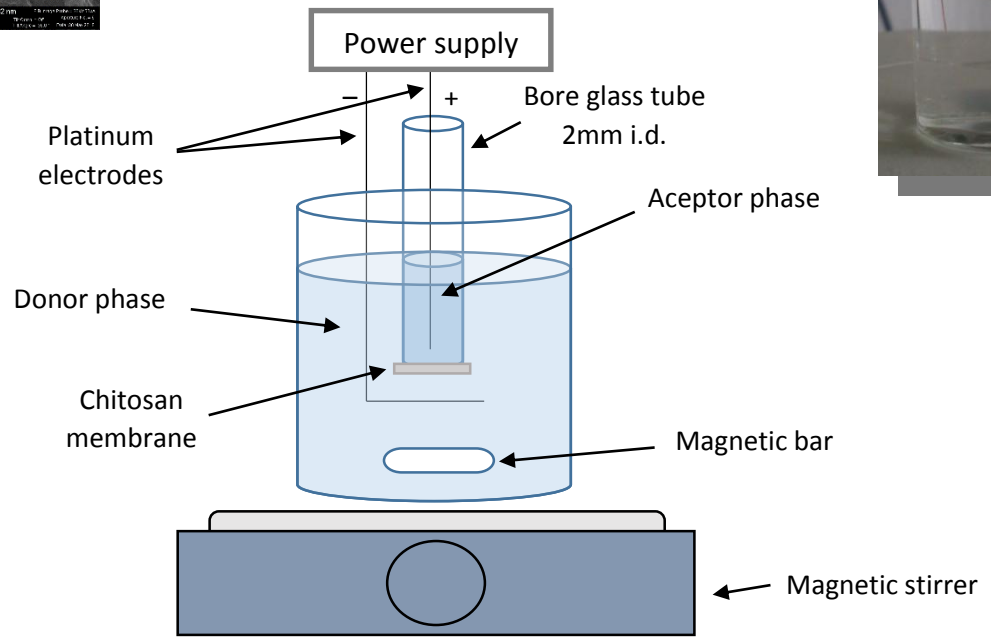
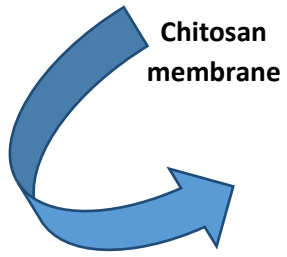
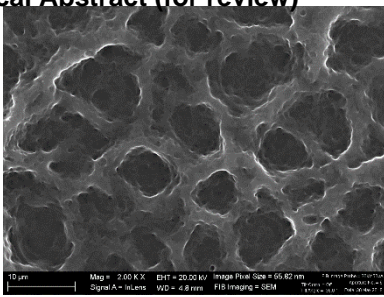
This manuscript describes the synthesis of a chitosan biopolymeric membrane 25-30  $\mu\text{m}$  thickness and its use as support for electromembrane extraction (EME). The composition of the membrane is 60% (w/w) chitosan and 40% (w/w) Aliquat®336. The proposed electromembrane extraction using the chitosan membrane as support is used for the simultaneous extraction of polar acidic drugs and non-steroidal anti-inflammatory drugs: amoxicillin, nicotinic acid, hippuric acid, salicylic acid, anthranilic acid, ketoprofen, naproxen and ibuprofen.

The proposed extraction protocol has been validated and successfully applied to the extraction of the target analytes in human urine samples.



## Highlights

- A new biopolymeric support for electromembrane extraction (EME) is proposed as a versatile alternative to classical polypropylene ones.
- The support consists in a 60% (w/w) chitosan and 40% (w/w) Aliquat®336 membrane of 30-35 µm thickness.
- Non steroidal anti-inflammatory drugs as well as polar acidic drugs have been extracted using the chitosan membrane as support in EME procedure.
- The EME procedure has been optimized and validated for the extraction of the target analytes, being successfully applied to their extraction in human urine samples.



## Chitosan tailor-made membranes as biopolymeric support for electromembrane extraction

Román-Hidalgo, Cristina<sup>1</sup>; López-Pérez, Germán<sup>2</sup>; Martín-Valero, María Jesús<sup>1\*</sup>; Bello-López, Miguel Ángel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de Sevilla, c/Prof. García González, s/n. 41012-Seville. SPAIN

<sup>2</sup>Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de Sevilla, c/Prof. García González, s/n. 41012-Seville. SPAIN

### Abstract

A chitosan membrane composed by 60% (w/w) chitosan and 40% (w/w) Aliquat®336 has been proposed as new biopolymeric support for electromembrane extraction. The new support has been characterized by scan electronic microscopy, being 30-35 µm thickness. Different pharmacological compounds as non steroidal anti-inflammatory drugs as well as polar acidic drugs (amoxicillin, nicotinic acid, hippuric acid, salicylic acid, anthranilic acid, ketoprofen, naproxen and ibuprofen) have been successfully extracted using the proposed support. High enrichment factors have been obtained. The target analytes have been satisfactorily extracted from human urine samples applying the proposed electromembrane extraction procedure. The chitosan membrane seems to be a promise alternative to classical supports for supported liquid membrane.

*Keywords:* chitosan; polymeric support; electromembrane extraction; pharmaceutical compounds

-----  
\* Corresponding author: María Jesús Martín Valero Tel: +34 954556308; fax: +34 954557168. E-mail address: [mmartin@us.es](mailto:mmartin@us.es); Miguel Ángel Bello López. Tel: +34 954557172; fax: +34 954557168. E-mail address: [mabello@us.es](mailto:mabello@us.es)

## Introduction

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin. It is obtained from natural sources, mainly aquatic organisms with hard skeletons like crabs, shrimps or lobsters. Even certain microorganisms like fungi can be used as natural source of this biopolymer. On the other hand, chitosan can also be obtained after a deacetylation process of chitin due to the fact that the chemical difference between both structures is that chitosan is formed by D-glucosamine units and chitin by N-acetyl-D-glucosamine units [1]. Deacetylation process can be done by means of chemical reactions (using alkaline solutions) or enzymatic processes, ranging the degree of deacetylation of resulting chitosan between 70 and 95% [2-4]. Biological activity, as well as much of its physical and chemical properties, is related to the degree of deacetylation of chitosan [5].

It is a hygroscopic pseudoplastic biopolymer and due to the presence of -OH and -NH<sub>2</sub> groups in its polymeric chain it can easily generate hydrogen bonding. Chitosan is soluble in inorganic acids (pH<6) and in several organic acids, being the usual solving media acetic acid (1% v/v, pH 4). It is insoluble in water and alkaline solutions due to the fact that the -NH<sub>2</sub> cannot be protonated in basic and neutral media. Molecular weight, deacetylation degree, temperature as well as concentration are the experimental variables that control the solubility of this biopolymer. The reactivity of chitosan highly depends on the amino functional groups in its chemical structure and the availability of these groups to be protonated [1].

It has been also described several properties of chitosan like biocompatibility, chelating ability, antimicrobial activity or gelation ability [6-8]. Also, chitosan is a material with characteristics of interest for hydrogel structures due to its hydrophilic nature and ability of degradation via human enzymes. Chitosan-based hydrogels have been studied for tissue engineering and pharmaceutical applications [9]. On the other hand, membranes made of chitosan have been commercialized since the beginning of 2000, having the advantage of their high water permeability as well as their ability to immobilize microorganisms [10].

Taking into account the described characteristics of chitosan, it seems to be of interest the synthesis of chitosan-based membranes in order to use them as support of liquid membranes in electromembrane extraction (EME) procedures. Within this realm, new supports of different nature have been recently proposed for carrying out EME experiments with satisfactory results. Polymer inclusion membranes [11, 12], polypropylene hollow fiber reinforced with carbon nanotubes [13-14] or with silver nanoparticles [15], nanostructured supports [16], and agar films containing silver nanoparticles [17] have been valid alternatives for EME procedures to the classical polypropylene materials.

Our research group has proposed and synthesized some of the new supports mentioned before, obtaining good results for the simultaneous extraction of NSAIDs and polar acidic drugs. In this case, chitosan-based membranes have been synthesized to

1 be used as support for SLM in an EME procedure for the extraction of compounds of  
2 different nature. The proposed procedure have been applied to the following  
3 compounds: amoxicillin (AMX), nicotinic acid (NIC), hippuric acid (HIP), salicylic  
4 acid (SAL), anthranilic acid (ANT), ketoprofen (KTP), naproxen (NAX) and ibuprofen  
5 (IBU). Besides, the EME procedure has been satisfactorily applied to human urine  
6 sample in order to determine the target analytes.  
7  
8  
9

## 10 **Experimental**

### 11 *Chemicals and reagents*

12  
13  
14  
15 All chemicals and reagents used were of analytical grade. Chitosan of different  
16 molecular weights (110000-150000 Da; 140000-220000 Da and 310000-375000 Da)  
17 was purchased from Aldrich (Madrid, Spain). Amoxicillin (AMX), nicotinic acid (NIC),  
18 salicylic acid (SAL), 1-octanol, dihexyl ether (DHE), nitro-phenyl-octyl-ether (NPOE)  
19 and Aliquat®336 were obtained from Fluka-Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).  
20 Anthranilic acid (ANT) and hippuric acid (HIP) were obtained from Alfa Aesar  
21 (Karlsruhe, Germany). Ketoprofen (KTP), naproxen (NAX), ibuprofen (IBU),  
22 hydrochloric acid, acetic acid, sodium hydroxide, sodium acetate, ammonia, methanol,  
23 ammonium chloride and tris(2-ethylhexyl)phosphate were obtained from Merck  
24 (Darmstadt, Germany). Daily prepared working solutions by adequate dilutions from  
25 aqueous solutions (400 mg L<sup>-1</sup>) of NIC, AMX, HIP and ANT were used. For SAL,  
26 KTP, NAX and IBU, dilutions were prepared from methanolic 400 mg L<sup>-1</sup> solutions.  
27 Ultrapure water from Milli-Q Plus water purification system (Millipore, Billerica, MA,  
28 USA) was used for preparing all solutions and dilutions.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

### 37 *Chitosan membrane synthesis*

38  
39 Synthesis of the chitosan membrane was as follows: 0.1 g of chitosan (310000-  
40 375000Da) was dissolved in 25 mL acetic acid 1% (v/v), being the pH of the resulting  
41 solution near to 3. Then, pH was adjusted to pH 5.0, adding drop to drop sodium  
42 hydroxide 1M. On the other hand, 0.066 g Aliquat®336 was weighted and placed in a  
43 vial. 25 mL of the chitosan solution was added in continuous stirring. Afterwards, this  
44 solution was poured onto a glass Petri dish (90 mm diameter), which was placed into a  
45 vacuum stove (35°C) till complete evaporation of the solvent. Once chitosan membrane  
46 was dried, the excess of acetic acid is removed by washing the membrane with 10 mL  
47 of sodium hydroxide 0.1M and 10 mL of water, for 30 minutes each one. This washing  
48 process was repeated twice. Finally, the washed membrane was placed again in the  
49 vacuum stove till dryness. Then, membrane was peeled off the dishes.  
50  
51  
52  
53  
54

55 The resulting membrane was 60% (w/w) chitosan and 40% (w/w) Aliquat®336,  
56 being of 30-35 µm thickness.  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### *EME procedure*

Electromembrane extraction of the target analytes was carried out using a self-made device previously used in our laboratory for EME of NSAIDs using agar films as support of the liquid membrane [17]. The support used in this case was the synthesized chitosan membrane described above. This membrane was glued to 4mm diameter, 2.5 cm length; 2 mm i.d. bore glass tubes. Afterwards, the membrane was impregnated with 5  $\mu$ L of octanol. Once removed the excess of organic solvent with a wipe, 50  $\mu$ L of ultrapure water (acceptor phase) were introduced inside the tubes using a microsyringe and then the tubes were placed into a 10 mL vial containing aqueous solution (donor phase). In order to develop EME procedure, platinum electrodes (0.25 mm diameter) were placed into the donor phase as well as the acceptor phase, keeping an average interelectrode distance of 2 mm. A 3CH Laboratory DC Power Supply (Benchtop Instrument, Pennsylvania, USA) with programmable voltage in the range 1-120 V was used for connecting both electrodes. In order to register the obtained current during the extraction process, a current digital multimeter was placed in serial. Figure 1 shows the device used for carrying out EME.

100 V was applied during 10 min with the donor phase stirring at 300 rpm. The average current registered during the extraction time was in the range 95-460  $\mu$ A. Once EME was carried out, acceptor phase were collected with a microsyringe and 20  $\mu$ L were injected in the HPLC system.

### *Chromatographic determination*

The HPLC separation of the target analytes were carried out using a LabChrom<sup>®</sup> VWR-Hitachi (Barcelona, Spain) liquid chromatograph, equipped with a quaternary L-7100 pump and a L-7455 diode array detector (DAD). Sample injection (20  $\mu$ L) was done using a L-2200 autosampler. The chromatographic column was a LiChroCART<sup>®</sup> 75-4 Purosphere<sup>®</sup> STAR RP-18e 3  $\mu$ m (75 mm $\times$ 4.0 mm i.d) (VWR, Darmstadt, Germany), with a Kromasil<sup>®</sup> 100 Å, C18, 5  $\mu$ m (15 mm $\times$ 4.6 mm i.d.) (Scharlab S.L., Barcelona, Spain) guard column. During elution, column was thermostated at 20°C.

Gradient elution was used for chromatographic separation, being 0.8 mL min<sup>-1</sup> the flow rate and the mobile phase was 0.05% aqueous formic acid (component A) and acetonitrile (component B). 99% (v/v) A were the initial conditions, decreasing to 90% in 3 minutes. This rate was maintained for 1 min, decreasing to 60% in 0.1 minutes, which was maintained till 12 min. Finally, %B (v/v) increased till 100% in 7 minutes. DAD detection was used for determining the analytes, being the monitoring wavelengths 230 nm for AMX, 260 nm for NIC, 235 nm for HIP, 235 nm for SAL, 224 nm for ANT, 255 nm for KTP, 224 nm for IBU and 230 nm for NAX, respectively.

## Results and discussion

In order to carry out preliminary EME assays, 10 mL of a standard aqueous solution of the target analytes ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) was used as donor phase and 50  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution was used as acceptor phase.

The first time that EME procedure was carried out using the synthesized chitosan membrane as support of SLM, an additional problem rose. Membranes were completely dissolved when contacting with water solutions, probably due to the presence of acetic acid residues in the membrane. To solve this problem, acetic acid residues were neutralized washing the membranes twice with sodium hydroxide 0.1M and water for 30 min and then introducing them in a vacuum stove at  $35^{\circ}\text{C}$  till complete elimination of water.

### *Composition and thickness of chitosan membrane*

The experimental variables studied were: type of chitosan (different molecular weight), rate of Aliquat®336 as well as volume of mixture chitosan/Aliquat®336 poured in the Petri dish for controlling the final thickness of the membrane.

Therefore, synthesis of the membrane was carried out using chitosan of three different molecular weights: 110000-150000 Da; 140000-220000 Da and 310000-375000 Da, respectively. 0.1g chitosan were dissolved in 25 mL acetic acid 1% (v/v). 25 mL of the solutions were poured out into 90 mm diameter Petri dishes and dried as described in Experimental Section. Microscopically visualization as well as EME tests showed that high molecular weight chitosan membranes were more homogeneous and led to more reproducible EME results. Additionally, no significance differences in EME behavior has been shown between the different kinds of chitosan membranes. Thus, high molecular weight chitosan membranes were selected for all the optimization process.

As it has been mentioned in the “Introduction section”, chitosan is a biopolymer with ionizable amine groups in its chemical structure. It is considered a weak base with a  $\text{pK}_a$  value of 6.1-6.5, depending on the degree of N-deacetylation [9, 18]. Thus, pH of solution in which the polymer is solved could be of great influence in the posterior extraction of the target analytes. At  $\text{pH} > 6.5$ , chitosan solutions become hydrogels, being this process irreversible. Whereas, pH of chitosan solved in the minimum amount of acetic acid (1% v/v) rounds 4. Therefore, different acetic/acetate solutions of high molecular weight chitosan were prepared adjusting the pH media to the following values 4, 4.5, 5, 5.7 and 6.4, respectively. After applying the EME procedure with the corresponding chitosan membranes, enrichment factors showed slightly differences, being those carried out with membranes of pH 5 the ones that offered higher enrichments. Consequently, it was decided to prepare chitosan membranes adjusting the pH to a value of 5.

1 On the other hand, different amounts of Aliquat®336 were also tested in order to  
2 obtain different rates of chitosan-Aliquat®336 (90:10; 60:40 and 30:70% (w/w),  
3 respectively). The synthesis of membranes was done as indicated in “Chitosan  
4 membrane synthesis” section. Membranes with variable flexibility were obtained. After  
5 developing EME, it was noticed that amount of Aliquat®336 influenced only in the  
6 physical properties of the membrane, not in the effectiveness of the extraction,  
7 therefore, in this case, it was deduced that the role of Aliquat®336 is just of plasticizer,  
8 not of carrier.  
9

10  
11 Thickness of the synthesized membrane was also tested. For this purpose,  
12 variable volumes of mixtures chitosan/Aliquat®336 (10, 15 and 25 mL) were poured  
13 out into the 90 mm diameter Petri dishes. Membranes obtained when pouring out 10 mL  
14 of mixture chitosan/Aliquat®336 were very thin, being difficult for their posterior  
15 handling. In the case of membranes obtained after pouring 15 mL, those containing low  
16 proportion of Aliquat®336 were so fragile that it was not possible to handle them  
17 without breaking. Those with higher proportion of Aliquat®336 were able to handle and  
18 work with them. In the case of membranes resulting from pouring 25 mL of mixture  
19 chitosan/Aliquat®336, all of them were of good consistence for working with them in  
20 the EME device.  
21  
22

23 Scanning Electron Microscopy (SEM) was used for characterizing membranes in  
24 terms of thickness and homogeneity. A Zeiss Auriga microscope was used for doing  
25 these measurements as well as for obtaining mapping images in which it can be  
26 observed how homogeneous the synthesized membranes were. 25-30 µm thickness were  
27 measured for membranes obtained after pouring in the Petri dishes 15 mL of  
28 chitosan/Aliquat®336 and 30-35 µm thickness for those obtained after pouring 25 mL  
29 of mixture (Figure 2a), respectively. A microscopic image showing the homogeneous  
30 pore size in the thicker chitosan membrane can be observed in Figure 2b.  
31  
32

33 Once synthesized all the membranes, preliminary EME was carried out in order  
34 to evaluate the better composition of the membrane as support for the SLM for  
35 extraction purposes. According to the enrichment factors obtained for all the analytes in  
36 each of the experiments it was concluded that membranes containing  
37 chitosan/Aliquat®336 60:40% (w/w) were those of higher enrichment factors. Besides,  
38 it was also observed that the molecular weight of chitosan did not affect to the  
39 efficiency of the extraction only to the homogeneity of the membrane. Consequently,  
40 the membranes selected for carrying out the EME posterior experiments were those  
41 made with chitosan/Aliquat®336 60:40% (w/w), 30-35 µm thickness, being chitosan of  
42 high molecular weight.  
43  
44

#### 45 *Organic solvent for SLM*

46  
47  
48

49 Diethyl ether (DHE), 1-octanol, nitrophenyl-octyl ether (NPOE) and mixtures  
50 (1:1) of the different solvents were tested as SLM. When using DHE, lowest enrichment  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 factors were obtained for all the target analytes (from 60 for NIC to 10 for NAX). The  
2 use of NPOE slightly improved the enrichment factors (10% higher) as well as using  
3 mixture 1-octanol-NPOE. When 1-octanol was used as SLM, better enrichment factors  
4 were obtained for all the target analytes, ranging between 125 and 32.  
5

6 Taking into account that at the end of the membrane synthesis several washes  
7 using sodium hydroxide 0.1M are done, it could be possible some losses of  
8 Aliquat®336 present in the membrane. Besides, Aliquat®336 is a cationic carrier and it  
9 could has an active role during the extraction procedure of the compounds. In order to  
10 check this is so, additional experiences of EME were carried out using as SLM a  
11 mixture of 1-octanol/Aliquat®336 5% (v/w) and 1-octanol/Aliquat®336 10% (v/w).  
12 Results obtained indicated that enrichment factors did not improve with the presence of  
13 Aliquat®336 in the SLM. Thus, EME of the target analytes is not a carrier mediated  
14 one, being the role of Aliquat®336 just of plasticizer.  
15  
16  
17  
18  
19  
20

### 21 *Influence of pH of acceptor and donor phases and voltage*

22  
23

24 An important variable for the EME efficiency is the pH of acceptor and donor  
25 phases. It has been widely studied the influence of this experimental variable in the  
26 development of EME due to the fact that, under determined conditions, electrolysis can  
27 occur generating H<sup>+</sup> and OH<sup>-</sup> which can change pH of the phases. Consequently, the  
28 performance of the analytes extraction can be affected [19-21]. In the case of acceptor  
29 phase, four different pH were studied: 5, 6, 10 and 12. 5 was the pH of deionized water,  
30 pH 6 was adjusted using a 100 mM acetate/acetic buffer, pH 10 adjusted with a 100 mM  
31 ammonium chloride/ammonia buffer and pH 12 was achieved with sodium hydroxide  
32 solution (10 mM). EME of these preliminary assays were carried out during 10 minutes  
33 ranging the applied voltage between 0 and 50V. Two important facts were observed: the  
34 use of buffers was not necessary because pH of the acceptor phase did not vary  
35 substantially during EME. On the other hand, higher enrichment factors were obtained  
36 for all the analytes as applied voltage increased. In Figure 3, the enrichment factors  
37 obtained for each of the experiments are plotted. It can be observed that at pH 5 the  
38 extraction was more efficient for all the analytes.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 On the other hand, the influence of pH of donor phase was also studied. pH of an  
47 aqueous solution of the target analytes (200 µg L<sup>-1</sup>) was measured, having a value of  
48 4.6. It was decided to develop additional experiments at pH ranging between 2 and 12.  
49 In Figure 4, the obtained enrichment factors for all the analyzed compounds are  
50 depicted. It can be noticed that in the case of NSAIDs, higher enrichment factors are  
51 obtained at pH 4.6 (which is the resulting pH of the solution containing all the  
52 compounds), decreasing as pH increases. Even when pH of donor phase is 12, none of  
53 these compounds are extracted. For pH<4.6 lower enrichment factors were also  
54 obtained. On the other hand, the extraction of polar compounds improve up to pH  
55 values ranging 4.6-7, decreasing considerably for pH>7. Consequently, pH of donor  
56 phase was set at a value of 4.6 for carrying out the EME procedure.  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Finally, in order to check the influence of the applied voltage, some EME  
2 experiments were carried out ranging the voltage from 10V to 120V. Figure 5 shows the  
3 obtained enrichment factors. From 20V to 30V, a big increase of the extraction is  
4 produced for all the compounds. In the case of NIC and HIP, when increasing the  
5 applied voltages (up to 100V) higher enrichment factors are obtained. SAL also  
6 behaviors in this same way, though the big improvement occurs from 50V to 80V. The  
7 extraction of ANT, KTP and NAX slightly improve when applied voltage are higher.  
8 IBU is extracted much more from 10V to 30V, decreasing its extraction when 50V is  
9 applied. From 50V to 120V, the enrichment factors obtained for this compound keep  
10 constant. The extraction of AMX improves from 80V to 100V. Accordingly, 100V was  
11 selected as applied voltage during EME process.  
12  
13  
14  
15  
16  
17

### 18 *Influence of time of extraction*

19  
20  
21 The last variable implemented was the time of extraction. Several experiences  
22 carrying out EME during 5, 7, 10, 15 and 20 min were done. 100V was applied in all  
23 cases. The optimal efficiency in the extraction (in terms of enrichment factors) was  
24 achieved when EME was developed during 10 min, keeping it practically constant from  
25 higher times. Therefore, 10 min was selected for carrying out the EME procedure.  
26  
27

28 Once optimizing all the experimental variables as it has been described above,  
29 EME process was carried out as indicated in the section “EME procedure”.  
30  
31  
32  
33

### 34 *Validation of the EME procedure*

35  
36  
37 Once optimized all the experimental variables, EME procedure of the target  
38 analytes was carried out applying 100 V during 10 min, with the donor phase (aqueous  
39 solution of the target analytes 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , pH 4.6) stirring at 300 rpm. Acceptor phase  
40 was ultrapure water. Under these conditions, enrichment factors for the compounds  
41 were as follows: 116 for NIC, 33 for AMX, 118 for HIP, 49 for ANT, 113 for SAL, 43  
42 for KTP, 30 for NAX and 20 for IBU, respectively. Taking into account the obtained  
43 values, it can be assessed that chitosan membranes are an efficient support for extracting  
44 NSAIDs as well as polar drugs by means of electromembrane extraction.  
45  
46  
47  
48

49 In order to complete the study of the research, since an analytical point of view,  
50 a validation process was done. This involves the calculation of the following quality  
51 parameters: linearity, sensitivity and precision.  
52  
53

54 Table 1 shows the calibration data of the chromatographic method, including  
55 linear range, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for all the  
56 analytes. For calculation of LOD and LOQ three times signal to noise ratio and ten  
57 times signal to noise ratio, respectively was considered [22]. It can be observed a good  
58 linearity in all cases. Values for linearity range between 98.9% for NIC and 94.0% for  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 AMX. Limit of detection range between 1.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  for KTP and 7.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  for IBU.  
2 Values between 3.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  for KTP and 22.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  for IBU were obtained for limit of  
3 quantitation. It has to be mentioned that in the case of AMX two different linear ranges  
4 were obtained at different concentrations, from 9 to 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  and from 21 to 80  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  
5 respectively.  
6

7  
8 One single day measurements as well as weekly measurements (three days per  
9 week) were done in order to evaluate the repeatability and the intermediate precision.  
10 These measurements were obtained applying the proposed EME protocol to human  
11 urine samples. The obtained %RSD were between 1-11% for repeatability and 5-14%  
12 for intermediate precision.  
13  
14

#### 15 *Application to real samples*

16  
17  
18 In order to check the suitability of the proposed method for urine analysis, blank  
19 human urine samples spiked at three concentration levels (according to the  
20 corresponding linear ranges) of the target analytes were diluted with ultrapure water  
21 (1:1000, v/v) and submitted to the EME/HPLC procedure. The obtained recoveries are  
22 depicted in Table 2. As it can be seen, values in accordance with the expected ones were  
23 achieved for all the compounds at the different concentration levels.  
24  
25  
26

27  
28 Additionally, real urine samples from volunteers submitted to a single dosage of  
29 ASA (500 mg) or IBU (600 mg) were diluted with ultrapure water (1:1000, v/v) and  
30 submitted to the EME/HPLC procedure. These analytes have been selected due to the  
31 fact that both are very common consumed drugs by population, being easily acquired at  
32 chemist's as tablets. Usual dosage of IBU ranges between 400 and 800 mg ingested  
33 three times a day. The complete elimination of this compound occurs after 24h from its  
34 intake, being approximately 10% excreted by urine 6-8h after its intake. 90% of IBU  
35 excretion is in form of metabolites, mainly as hydroxylates and carboxylates  
36 compounds and its conjugates [23-24]. In the case of SAL, this compound is generated  
37 by hydrolysis from acetylsalicylic acid (ASA). ASA is the active principle of aspirin, which is  
38 a usually consumed drug with antipyretic and analgesic properties [25], being 100%  
39 excreted as SAL in a period of time ranging 2-4h after administration. Studies have  
40 been reported in the hundreds of  $\mu\text{g mL}^{-1}$  the usual SAL levels in urine [26]. HIP is one  
41 of the main human urinary endogenous metabolite, which can be found at high  
42 concentrations in urine due to children diabetes, possible toluene intoxication or renal  
43 failures [27-29]. In the literature, it has been also reported that HIP levels in urine can  
44 be increased due to the consumption of aspirin. A diet rich in fruits and vegetables can  
45 also increase its levels [30].  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

54 Figure 6 shows chromatograms of the real samples analyzed. As it can be seen,  
55 urine sample from the volunteer that had ingested ASA showed, additionally to the SAL  
56 peak, an intense peak that can be due to the presence of HIP. In order to confirm the  
57 SAL, HIP and IBU levels found, these compounds were added, at two levels, to the  
58 original urine samples and submitted to the proposed procedure (Table 3). First, it is  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 remarkable the excellent recoveries of the spiked urine samples that confirm the  
2 suitability of the method. In the urine sample from the volunteer who had-ingested  
3 ASA, SAL level found was 20 mg L<sup>-1</sup>. This is a value lower than the expected one,  
4 being a possible explanation the fact that urine sample was collected only 2h after the  
5 intake of ASA. HIP has been also determined in this urine sample. The volunteer to  
6 whom urine sample belonged had not been exposed to toluene, neither had diabetes, nor  
7 other possible cause for having high levels of HIP in urine. Nevertheless, a high  
8 concentration of this compound has been determined (1048 mg L<sup>-1</sup>) in this sample. As it  
9 has been mentioned above, this endogenous metabolite can appear at high levels in  
10 urine from people with a diet rich in fruits as well as because the consumption of  
11 aspirin. In this case, the volunteer met both requirements, thus the amount of HIP  
12 determined in this urine sample is justified. On the other hand, the urine sample  
13 obtained after the intake of IBU showed a concentration of this drug in accordance to  
14 the expected amount.  
15  
16  
17  
18  
19  
20

## 21 **Conclusions**

22  
23  
24 A new biopolymeric support for the liquid membrane consisting of a chitosan  
25 membrane (60% (w/w) chitosan and 40% (w/w) Aliquat®336) of 30-35 µm thickness  
26 has been used for developing the electromembrane extraction of pharmacological  
27 compounds of different nature, polar acidic drugs and non steroidal anti-inflammatory  
28 drugs.  
29  
30

31  
32 High enrichment factors have been obtained for most of the compounds, with  
33 ranges between 118 for HIP and 113 for SAL, whereas good values (49-20) have been  
34 obtained for ANT, AMX, KTP, NAX and IBU. Besides, the proposed EME procedure  
35 has been satisfactorily applied to human urine samples. These results indicate that this  
36 kind of tailor-made membranes could be used as suitable and alternative support for  
37 SLM, allowing future structural modifications on demand of the nature of the extracted  
38 compounds.  
39  
40  
41  
42

## 43 **Acknowledgements**

44  
45  
46 This work was supported by the Project CTM2015-67902-C-1-P from the  
47 “Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional de I+D+i (Ministerio  
48 de Educación y Ciencia, Spain)”  
49  
50

51  
52 CRH is grateful to Universidad de Sevilla for personal funding through the V  
53 Plan Propio de Investigación de la Universidad de Sevilla.

54  
55 We are grateful to Servicio de Microscopía of the Centro de Investigación,  
56 Tecnología e Innovación of the Universidad de Sevilla (CITIUS) for the Scanning  
57 Microscopy studies.  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

- [1] S. Ahmed, S. Ikram, (Eds). Chitosan. Derivatives, composites and applications. John Wiley & Sons, Dehli, India, 2017.
- [2] M. Rinaudo Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym. Int.* 57 (2008) 397–430.
- [3] M. Riaudo, Physical properties of chitosan and derivatives in sol and gel states. In: B. Sarmiento, J. das Neves, (Eds). Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics. John Wiley & Sons; Chichester, UK, 2012.
- [4] I. Younes, S. Hajji, V. Frachet, M. Rinaudo, K. Jellouli, M. Nasri. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *Int J Biol Macromol.* 69 (2014) 489-98.
- [5] I. Younes, M. Rinaudo. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications, *Mar. Drugs* 13(3) (2015) 1133-74.
- [6] S. Thomas, N. Ninan, S. Mohan, E. Francis, (Eds) Natural Polymers, Biopolymers, Biomaterials, and Their Composites, Blends and IPNs. Apple Academic Press, Toronto, Canada, 2013.
- [7] J. Ma, Y. Sahai. Chitosan biopolymer for fuel cell applications. *Carbohydr Polym.* 92(2) (2013) 955-75.
- [8] S. Ahmed, M. Ahmad, S. Ikram, Chitosan: A natural antimicrobial agent- A review. *J. Applicable Chem.* 3 (2014) 493-503.
- [9] F. Ahmadi, Z. Oveisi, S. Mohammadi Samani, Z. Amoozgar, Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res. Pharm. Sci.* 10(1) (2015) 1-16.
- [10] C. Clasen, T. Wilhelms, W.M. Kulicke. Formation and Characterization of Chitosan Membranes. *Biomacromolecules*, 7 (11) (2006) 3210–3222.
- [11] N.A. Mamat, H.H. See, Development and evaluation of electromembrane extraction across a hollow polymer inclusion membrane, *J. Chromatogr. A.* 1406 (2015) 34-39.
- [12] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín, R. Fernández-Torres, M.A. Bello-López. Use of Polymer Inclusion Membranes (PIMs) as support for electromembrane extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and highly polar acidic drugs, *Talanta* 179 (2018) 601-607.
- [13] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, H. Ahmar, A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube

1 reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine,  
2 breast milk and wastewater samples, *J. Chromatogr. A.* 1285 (2013) 1-6.

3 [14] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, Development and application of carbon  
4 nanotubes assisted electromembrane extraction (CNTs/EME) for the determination of  
5 buprenorphine as a model of basic drugs from urine samples, *Anal. Chim. Acta* 767  
6 (2013) 75-80.  
7  
8

9 [15] M. Ramos Payán, R. Fernández Torres, J.L. Pérez-Bernal, M. Callejón Mochón,  
10 M.A. Bello López, A novel approach for electromembrane extraction based on the use  
11 of silver nanometallic-decorated hollow fibers, *Anal. Chim. Acta* 849 (2014) 7-11.  
12  
13

14 [16] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín-Valero, R. Fernández-Torres, M. Callejón-  
15 Mochón, M.A. Bello-López, New nanostructured support for carrier-mediated  
16 electromembrane extraction of high polar compounds, *Talanta* 162 (2017) 32-37.  
17  
18

19 [17] C. Román-Hidalgo, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, M.J. Martín-Valero,  
20 M.A. Bello-López, Agar films containing silver nanoparticles as new support for  
21 electromembrane extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1519-1525.  
22  
23

24 [18] J.W. Park, K.H. Choi, Acid-Base Equilibria and Related Properties of  
25 Chitosan, *Bull. Korean Chem. Soc.* 4 (1983) 68-72.  
26  
27

28 [19] A. Slampová, P. Kubán, P. Bocek, Quantitative aspects of electrolysis in  
29 electromembrane extractions of acidic and basic analytes, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015)  
30 92-100.  
31  
32

33 [20] A. Slampová, P. Kubán, P. Bocek, Additional considerations on electrolysis in  
34 electromembrane extraction, *J. Chromatogr. A.* 1429 (2016) 364-368.  
35  
36

37 [21] P. Kubán, P. Bocek, The effects of electrolysis on operational solutions in  
38 electromembrane extraction: The role of acceptor solution, *J. Chromatogr. A.* 1398  
39 (2015) 11-19.  
40  
41

42 [22] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*, 4<sup>th</sup>  
43 ed. Prentice Hall, London, 2000.  
44  
45

46 [23] E.J. Antal, C.E. Wright, B.L. Brown, K.S. Albert, L.C. Aman, N.W. Levin, The  
47 influence of hemodialysis on the pharmacokinetics of ibuprofen and its major  
48 metabolites, *J. Clin. Pharmacol.* 26(3) (1986) 184-190.  
49  
50

51 [24] B.G. Katzung, D.E. Furst, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease-  
52 modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics, drugs used in gout, in: *Basic and*  
53 *clinical pharmacology*, 7<sup>th</sup> Ed., Appliton and Lang Stamford, Connecticut, 1998.  
54  
55

56 [25] B.E. Cham, J.H.M. Dykman, F. Bochner, Urinary excretion of aspirin, *Br. J. Clin.*  
57 *Pharmac.* 14 (1982) 562-564.  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 [26] A.P. Pagani, G.A. Ibañez, Second-order multivariate models for the processing of  
2 standard-addition synchronous fluorescence–pH data. Application to the analysis of  
3 salicylic acid and its major metabolite in human urine, *Talanta* 122 (2014) 1-7.

4  
5 [27] M.S. Goligorsky, Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney  
6 disease: a retrospective and what the future may hold. *Kidney Research and Clinical  
7 Practice* 34 (2015) 76–82.

8  
9  
10 [28] S. Decharat, Hippuric Acid levels in paint workers at steel furniture manufacturers  
11 in Thailand. *Safety and Health at Work* 5 (2014) 227–233.

12  
13 [29] M. An, Y. Gao, Urinary biomarkers of brain diseases. *Genomics, Proteomics &  
14 Bioinformatics*, 13 (2015) 345–354.

15  
16  
17 [30] O. Agüero Sánchez, H. Díaz Padrón, T. Guevara Andreu, E. Cisneros Prego, I.  
18 Sánchez Jacas, Valores de ácido hipúrico en orina en trabajadores expuestos a tolueno.  
19 *Revista Cubana de Salud y Trabajo* 11(3) (2010) 45-50.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table 1**

Table 1. Calibration data, Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ) for the analytes

Analyte	Linear range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Linearity		LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
		(%)	( $R^2$ )		
NIC	7-100	98.9	0.9987	2.0	7.0
AMX	9-20	94.0	0.9964	3.0	9.0
	21-80	96.7	0.9989	6.0	21.0
HIP	8-90	98.3	0.9978	2.0	8.0
ANT	14-100	97.0	0.9956	4.0	14.0
SAL	6-20	95.8	0.9965	2.0	6.0
KTP	3-25	98.2	0.9993	1.0	3.0
NAX	15-100	97.3	0.9978	5.0	15.0
IBU	22-100	97.1	0.9975	7.0	22.0



Table 2. Recoveries (%) of the target analytes using EME/HPLC procedure from spiked human urine samples.

Analyte <sup>a</sup>	Urine spiked concentration (mg L <sup>-1</sup> )		
	10	25	50
NIC	80.0	96.1	97.3
AMX	91.2	89.7	95.3
HIP	86.9	103.5	94.6
ANT	85.1 <sup>b</sup>	103.2	92.7
SAL	92.4	99.9 <sup>c</sup>	—
KTP	93.1 <sup>d</sup>	89.8 <sup>e</sup>	90.9 <sup>c</sup>
NAX	99.1 <sup>b</sup>	89.9	80.2
IBU	—	92.8	98.3

<sup>a</sup>Average of three determinations (RSD < 6%)

<sup>b</sup>15 mg L<sup>-1</sup>

<sup>c</sup>20 mg L<sup>-1</sup>

<sup>d</sup>5 mg L<sup>-1</sup>

<sup>e</sup>10 mg L<sup>-1</sup>

Table 3. Application of EME proposed procedure to real human urine samples. (See text for details).

Analyte	Ingested doses (mg)	Excretion time (h)	Spiked level (mg L <sup>-1</sup> )	Concentration found in urine <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )
IBU	600	7	0	289
			25	310
			50	336
SAL	500 <sup>b</sup>	2	0	20.1
			5	24.8
			10	29.6
HIP	0	2	0	1048
			100	1140
			200	1237

<sup>a</sup>Average of three determinations (RSD < 6%)

<sup>b</sup>As acetylsalicylic acid

Figure 1. EME experimental device.

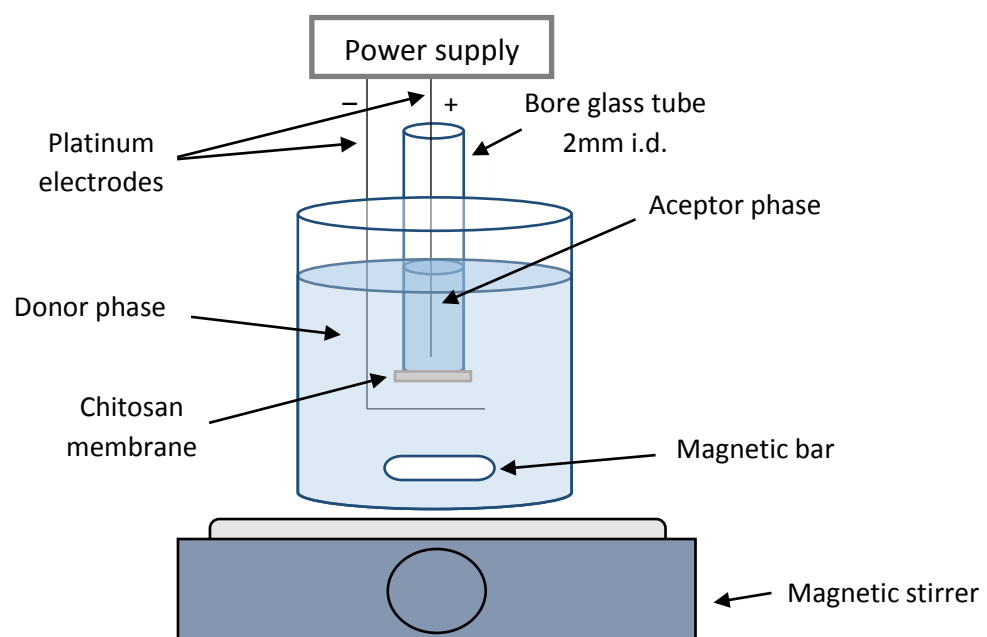
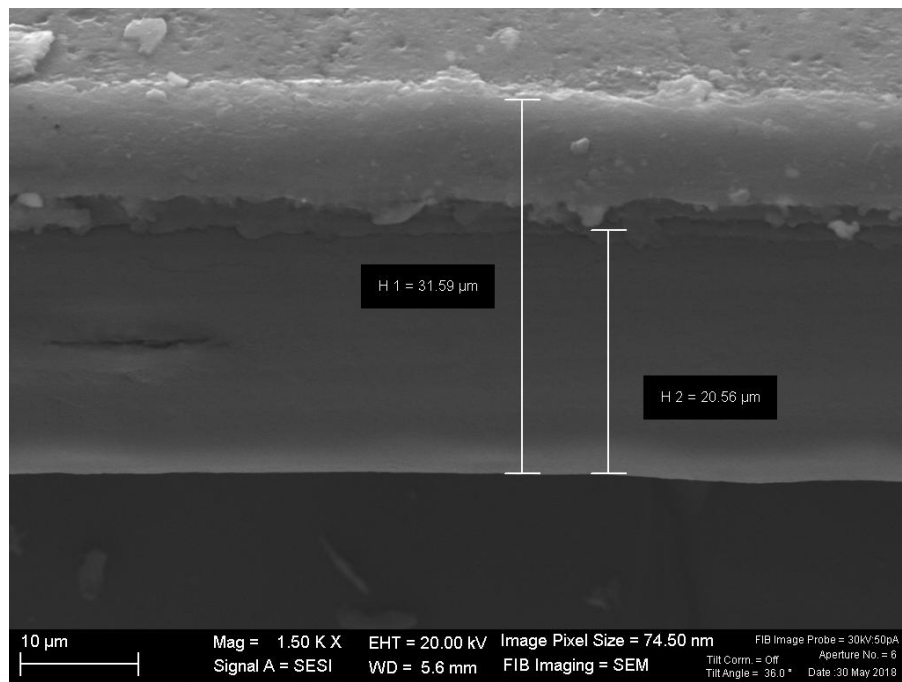
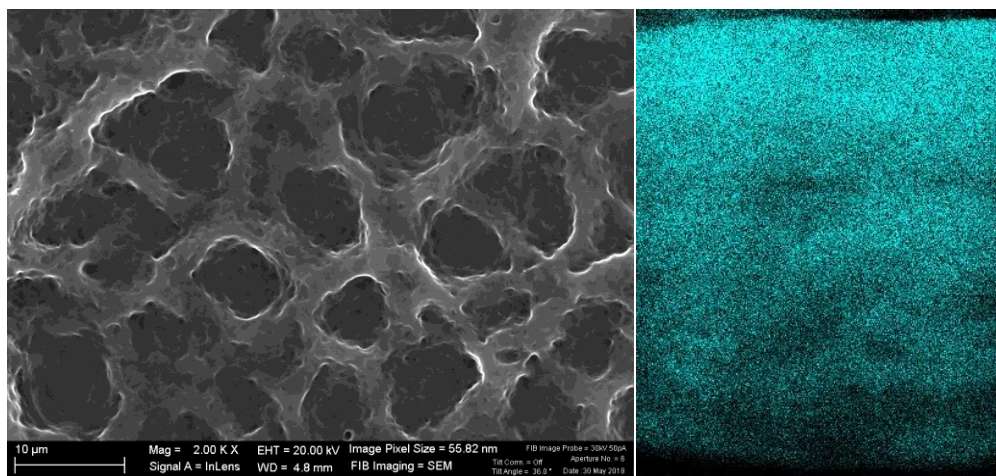


Figure 2. SEM images of chitosan thicker membrane



(2a) Thickness measurement



(2b) Homogeneous distribution of the chitosan membrane structure

Figure 3. Influence of the acceptor phase pH at 50V during 10 minutes.

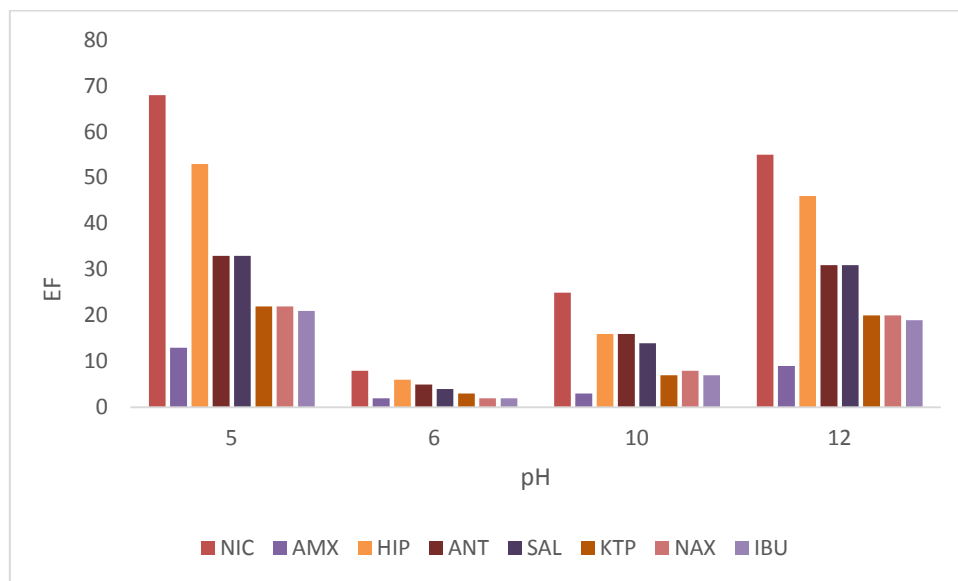




Figure 5. Influence of the applied voltage in the efficiency of EME

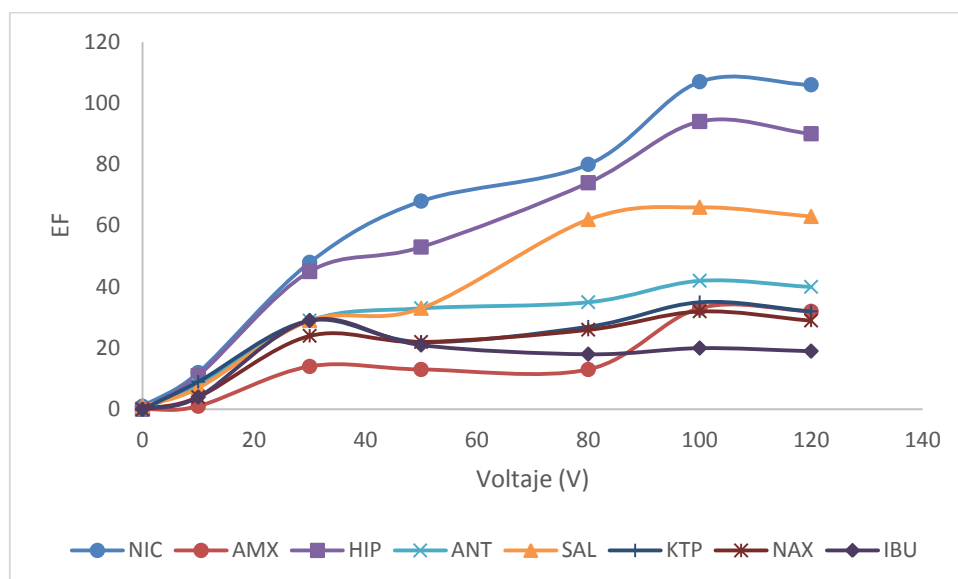
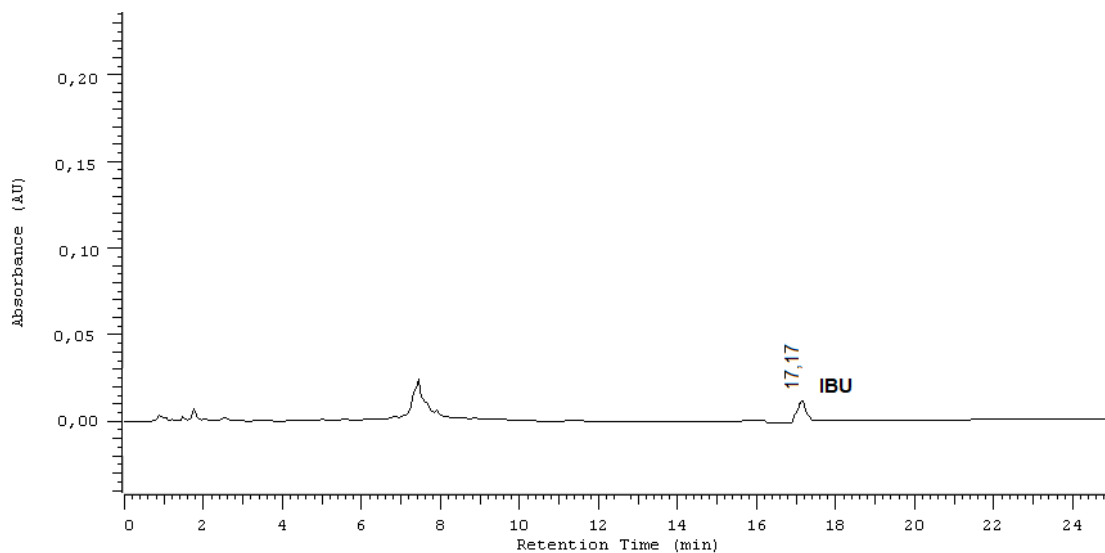
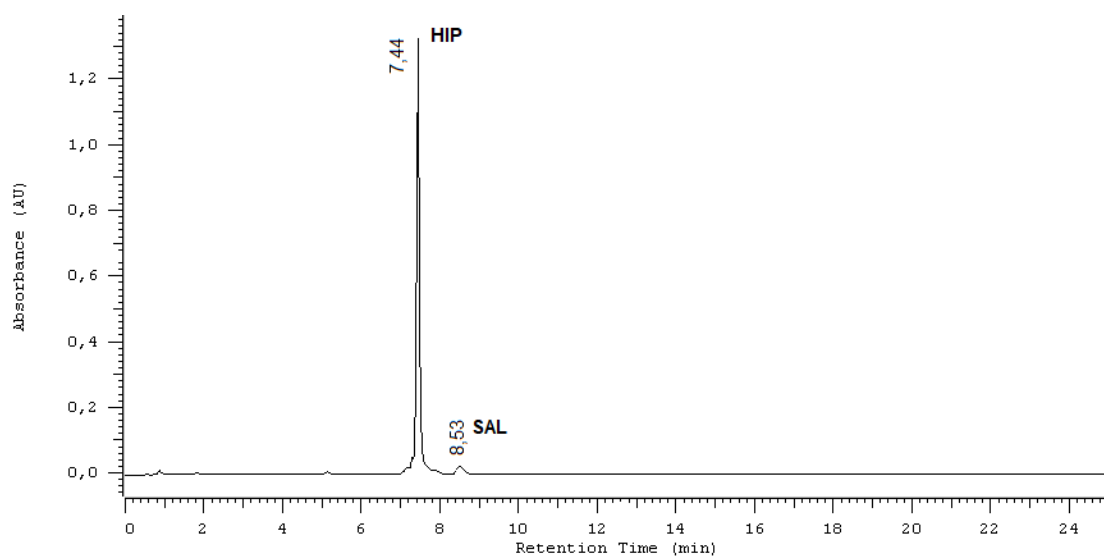


Figure 6. HPLC chromatograms of human urine samples submitted to the EME procedure. (a) human urine sample collected 7h after an oral administration of 600 mg of ibuprofen (b) human urine sample collected 4h after an oral administration of 500 mg of acetylsalicylic acid.



(a)



(b)



### **Captions of figures**

Figure 1. EME experimental device.

Figure 2. SEM images of chitosan thicker membrane.

Figure 3. Influence of the acceptor phase pH at 50V during 10 minutes.

Figure 4. Influence of the donor phase pH at 50V during 10 minutes.

Figure 5. Influence of the applied voltage in the efficiency (Enrichment factors) of EME.

Figure 6. HPLC chromatograms of human urine samples submitted to the EME procedure. (a) human urine sample collected 7h after an oral administration of 600 mg of ibuprofen (b) human urine sample collected 4h after an oral administration of 500 mg of acetylsalicylic acid.

### **Captions of tables**

Table 1. Calibration data, Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ) for the analytes.

Table 2. Recoveries (%) of the target analytes using EME/HPLC procedure from spiked human urine samples.

Table 3. Application of EME proposed procedure to real human urine samples. (See text for details).

**Suggested Reviewers:**

Stig Pedersen-Bjergaard Dr Prof,  
School of Pharmacy, University of Oslo. Norway  
stig.pedersen-bjergaard@farmasi.uio.no  
Expertise on EME

Nickolaj Jacob Petersen Dr  
Faculty of Pharmaceutical Sciences. Department of Physical Chemistry,  
University of Copenhagen. Denmark  
nickolaj.petersen@sund.ku.dk  
Expertise on EME

Pavel Kubáň Dr  
Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences,  
Brno. Czech Republic.  
kuban@iach.cz  
Expertise on EME

## ANEXO II.

Estancias en centros de investigación extranjeros

---



A lo largo de esta tesis se han realizado tres estancias de investigación en centros extranjeros como actividades complementarias a la formación predoctoral. Durante dichas estancias se ha colaborado con grupos de investigación pioneros a nivel mundial en sistemas de microextracción en fase líquida para el desarrollo y optimización de diferentes modalidades de LPME y EME. El objetivo común de las estancias se ha centrado en la puesta a punto de procedimientos innovadores de microextracción en fase líquida, así como en la aplicación de los mismos a muestras biológicas, profundizando en los aspectos esenciales de estos sistemas con especial énfasis a soportes, geometrías, membranas líquidas soportadas, miniaturización y acoplamiento instrumental.

Throughout this thesis, three research stays have been carried out at foreign research centers as complementary activities to PhD education. During them, collaboration with pioneering research groups worldwide in liquid phase microextraction systems for the development and optimization of different LPME and EME modalities has been conducted. The common objective of these stays was focused on the development of innovative procedures of liquid phase microextraction, as well as their application to biological samples, deepening in the essential aspects of these systems with special emphasis to supports, geometries, supported liquid membranes, miniaturization and instrumental coupling.



## FIRST STAY SUMMARY

The first stay was developed at the Department of Pharmacy of the Faculty of Health and Medical Sciences of the University of Copenhagen (Denmark) under the supervision of Professor Stig Pedersen-Bjergaard, Nickolaj J. Petersen and Jörg P. Kutter from 1<sup>st</sup> September 2016 to 30<sup>th</sup> November 2016.

The project of this stay was focused on down-scaling conventional EME to nano-EME, reducing the volume of the acceptor phase and coupling it directly to capillary electrophoresis. For this purpose, a system for selective extraction directly into a separation capillary has been developing with a membrane reusable for repeatable extractions without carry-over between samples. Five basic drugs substances (pethidine (PET), nortriptyline (NOR), methadone (MET), haloperidol (HAL) and loperamide (LOP)) were extracted as model analytes from 200  $\mu$ L acidified (10mM HCl) sample solution, through a supported liquid membrane (SLM) of 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE), and into approximately 10 nL phosphate buffer (pH 2.7) as acceptor phase. The driving force for the extraction was an electrical potential sustained over the SLM. The acceptor phase was located inside a fused silica capillary (TSP050375, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) of 50  $\mu$ m i.d. This capillary was also used for the final analysis of the acceptor phase by capillary electrophoresis (CE) with an Agilent Technologies HP<sup>3D</sup> CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a UV-DAD detector. In that way the sample preparation performed by nano-EME was coupled directly with a CE separation. The nano-EME system was realized in a crack made with a Epilog Mini 18 Laser Engraver (Epilog Laser, Colorado, USA) in the fused silica CE capillary, which was surrounded by a SLM.

The system was successfully optimized, it was repeatable and the same membrane could be used for several times without carry-over.

In the experiments carried out with the system, the existence of matrix effect was found out. For this reason, nano-EME system was also used to

investigate matrix effects when down-scaling electromembrane extraction to the nano-dimensions.

Results obtained from this research were included in a publication in a high impact factor analytical journal:

David Fuchs, Cristina Román-Hidalgo, María Ramos-Payán, Nickolaj J. Petersen, Henrik Jensen, Jörg P. Kutter, Stig Pedersen-Bjergaard, Continuous electromembrane extraction coupled with mass spectrometry - Perspectives and challenges, *Analytica Chimica Acta* 999 (2018) 27-36 (DOI: 10.1016/j.aca.2017.09.027).



## SECOND STAY SUMMARY

The second stay was also developed at the same research group of the University of Copenhagen mentioned above from 1<sup>st</sup> September 2017 to 30<sup>th</sup> November 2017. In this case, the project of the stay consisted of optimizing and characterizing electromembrane extraction of acidic drugs in microfluidic devices.

The scope of the project was to optimize the supported liquid membrane in the chip for selective extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and optimize the system in order to be used for multiple extractions without loss of performance. For this purpose, three NSAIDs were selected: ibuprofen (IBU), naproxen (NAX) and ketoprofen (KTP).

It was used a microchip device consisting basically of two poly(methyl methacrylate) (PMMA) plates with individual channels for acceptor and sample solutions, respectively, and a 25  $\mu\text{m}$  thick porous polypropylene membrane impregnated with the organic solvent in between.

One of the obstacles working with electromembrane extractions in microfluidic devices is that the extraction current causes electrolysis and bubble formation in the extraction channel. This was solved by incorporating a small amount of 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE) in the undecanol liquid membrane that decreased the current without affecting the efficiency of the extractions. The SLM consisting of a mixture of 1-undecanol and NPOE in a ratio 1:3 (v/v) was found to be the most suitable liquid membrane for the extraction of these acidic drugs under dynamic conditions. It showed a long-term stability of at least 8 hours, a low system current around 20  $\mu\text{A}$ , and recoveries over 94% for the target analytes. NPOE was included in the SLM to significantly decrease the extraction current compared to pure 1-undecanol, while the extraction properties was almost unaffected. Besides, it was also found out that stable extractions could be obtained if the supported liquid membrane had been immobilized at least 8 hours before the first extraction, getting the same extraction performance after a whole

working day. Moreover, it has been successfully applied to the determination of the target analytes in human urine samples, providing high extraction efficiency.

A manuscript is in preparation to publish these valuable findings in a high impact factor analytical journal.

### THIRD STAY SUMMARY

The last stay was developed at the Department of Electromigration Methods of the Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences (CAS) (Brno, Czech Republic) under the supervision of the Dr. Pavel Kubáň, Head of the Department, from 1<sup>st</sup> August 2018 to 31<sup>th</sup> October 2018.

The major objective of this research stay was to examine novel nanofibrous membranes as supporting materials for liquid membrane extractions in-line coupled to capillary electrophoresis. For this purpose, a disposable microextraction device was made, which was compatible with injection system of commercial CE instruments. It consisted of two PP units (cut from 200  $\mu$ L PP micropipette tips) containing acceptor and donor solutions, respectively, which were interspaced by a thin nanofibrous membrane (polyamide-6 (PA6) 30  $\mu$ m thickness), which could be impregnated with suitable organic solvent (SLM).

The hyphenated SLM-CE technique was examined by direct injections of model analytes from complex samples relevant for biomedical applications. One common capillary electrophoresis method for separations of basic drugs and acidic drugs was optimized and model analytes were extracted by the novel format of SLM extractions. SLM extraction across nanofibrous membrane ensured minimum consumption of organic solvent (1  $\mu$ L) and minimum sample consumption ( $\mu$ L volumes) per extraction, moreover, the extraction process was fully compatible with commercial CE instrumentation. The technique was thus well suitable for automated, rapid and efficient determination of various drugs in body fluid samples (serum, plasma, urine, dried blood spot) and might be applied in therapeutic drug monitoring assays, especially in those, where volumes of the body fluids are limited (DBS, infants, elderly people, etc).

A manuscript is in preparation to publish the results from this research in a high impact factor analytical journal.