






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Design and optimisation of new microfluidic devices for biological sample extraction systems

Elia Santigosa Murillo

Tesis Doctoral

Doctorado en Química

Directoras: María Muñoz Tapia, María Ramos Payán

Departament de Química

Facultat de Ciències

2022

Memoria escrita y presentada por Elia Santigosa Murillo para aspirar al Grado de Doctor

Elia Santigosa Murillo

Agradecimientos

Me gustaría que en las siguientes líneas quede reflejado mi gran sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que han hecho posible de una forma u otra esta Tesis Doctoral:

En primer lugar a las directoras de esta Tesis, Prof. María Muñoz Tapia y Prof. María Ramos Payán, por su apoyo, por su guía y gran dedicación. Gracias por confiar en mí y brindarme la oportunidad de poder trabajar a vuestro lado, formándome tanto profesional como personalmente. En el ámbito científico, así como en otros aspectos que me han permitido crecer hasta la persona que soy hoy.

A la Universidad Autónoma de Barcelona por concederme la beca PIF que ha financiado esta Tesis Doctoral.

A cada uno de los profesores, investigadores y técnicos que han colaborado de una manera u otra en esta Tesis, destacando la aportación de Xavier Muñoz, Pablo Giménez, Santiago Maspoch, Jordi Coello y Juan Manuel Ríos. Sin vuestra ayuda y aportación tampoco hubiera sido posible la finalización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Judith, Marta, Diego, Franc, Aira, Anna, Mon, Elena, Laia, Victor, Arnau, Carlos y Saptam, por vuestra ayuda cuando surgían dudas, por vuestro tiempo y dedicación, por los cafés interminables y por hacerme sentir una más en una ciudad que no era la mía

A mi supervisor el Prof. Stig Pedersen-Bjergaard y a mi compañero de laboratorio Dr. Frederik Hansen durante mi estancia doctoral en la Universidad de Oslo, a pesar de los meses difíciles de pandemia conseguimos sacar un buen trabajo.

A todos mis amigos fuera del laboratorio, simplemente sois mi familia aquí en Barcelona. También a los que se tuvieron que ir a otras ciudades, da igual donde estéis, por mucho que pase el tiempo nada cambiará.

A Cecilia, Paloma y Óscar, sucesos, vivencias e historias que hacen embozar una sonrisa en mi boca.

A Jessica y a Maria por aguantar mis altibajos, por sacarme una sonrisa cuando todo estaba oscuro, por darme la paz en mitad de la tormenta. Quiero recordaros que las casualidades no existen y por algo estáis y estoy en vuestras vidas.

A toda mi familia, en especial a mis padres y mi tía Tina, por confiar en mí cuando incluso yo no lo hacía, por darme los valores que han hecho de mí la mujer que soy y de la cual sé que estáis orgullosos. Indudablemente sin vuestro apoyo no estaría hoy aquí. A mi Primi, ya que eres mi hermana y con quien sé que siempre puedo contar. A Wolframio, por estar siempre a mi lado y sacarme la mejor sonrisa al abrir la puerta.

Por último, sé que te hubiera encantado verla terminar y verme exponer a pesar de no entender nada, tú sabías mejor que yo que finalizaría esta memoria. Por eso, aunque ya no estés, esta Memoria va dedicada a ti ABUELA. Y recuerda....

De los cobardes nunca se ha escrito nada

Índice general	i
Índice figuras	vii
Índice tablas	ix
Abreviaciones	x
Objetivo	xi
Objective	xiii

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Técnicas de extracción	3
1.1.1. Microextracción en fase líquida (LPME).....	7
1.1.2. Microextracción mediante electromembrana (EME).....	9
1.2. Dispositivos microfluídicos.....	10
1.2.1. Parámetros operacionales que influyen en el procedimiento de LPME y EME en dispositivos microfluídicos.	17
1.3. Evaluación del rendimiento de extracción.....	25
1.4. espectroscopía de impedancia (EIS)	26
1.4.1. Elementos impedimétricos	28
1.4.2. Aplicaciones de medidas de EIS en sistema de electromicroextracción (EME) con membranas planas.....	32
1.5. Referencias	35
2. Results and discussion.....	43
2.1. Impedance model for voltage optimization of parabens extraction in an electromembrane milifluidic device.	44

2.2. An efficient microfluidic device based on electromembrane extraction for the simultaneous extraction of acidic and basic drugs.....	49
2.3. Electromembrane extraction using deep eutectic solvents as the liquid membrane.....	54
2.4. Green microfluidic liquid-phase microextraction for polar and non-polar acids from urine	61
2.5. A microfluidic method for the simultaneous extraction of polar and non-polar basic analytes from urine samples (under revision).....	65
2.5.1. Introduction	66
2.5.2. Experimental	68
2.5.3. Results and discussion.....	70
2.5.4. Evaluation of analytical performance	78
2.5.5 Real samples analysis	79
2.5.6. Conclusions	81
2.5.7.References	82
3. Conclusiones/ Conclusions	88
Annex I.....	97
Annex II.....	99

Índice figuras

Fig. 1. Esquema evolutivo de las técnicas de extracción.	7
Fig. 2. a) Esquema de modalidad LPME en dos fases. b) Esquema de modalidad LPME en tres fases	8
Fig. 3. Esquema de EME mediante electromigración para analitos ácidos.	9
Fig. 4. Primeras miniaturizaciones microfluídicas basados en LPME en tres fases. A) En 1986. B) En 1992. C) En 1994	11
Fig. 5. Primer dispositivo microfluídico basado en LPME en dos fases (2000).	12
Fig. 6. Evolución de la técnica EME y LPME <i>on-chip</i> (3 fases). a) En 2010. b) En 2014. c) En 2015. d) 2016	15
Fig. 7. Evolución doble dispositivo LPME/EME on chip (3 fases). a) En 2016. b) En 2018. c) 201917	
Fig. 8. Esquemas de automatización en dispositivos microfluídicos integrados en LPME a) un equipo de HPLC y b) a un equipo de MS.	24
Fig. 9. Diagrama de Nyquist equivalente a una en serie con un condensador	29
Fig. 10. Diagrama de Nyquist equivalente a un en paralelo de una resistencia a la transfrecuencia de carga con un condensador y en serie a la resistencia a la solución.....	31
Fig. 11. a) Diagrama de Nyquist equivalente a un circuito de Randles b) Ejemplo espectro de impedancia de un sistema complejo	32
Fig. 12 Esquema del circuito equivalente de un dispositivo 96-well plates.....	34
Fig. 13. Scheme of the μ EME device	44
Fig. 14. Electrical parameters scheme of μ EME device (i) The device without μ EME, (ii) the device with μ EME, (iii) the device μ EME device with octanol	46
Fig. 15. Relation between extraction efficiency (%) and $R_{m_{oct}}$ vs voltage.....	47
Fig. 16. Voltage optimization. SLM: 1-octanol, flow rate (donor phase): $3 \mu\text{L min}^{-1}$, flow rate (acceptor phase): $1 \mu\text{L min}^{-1}$, donor phase composition: pH 3, acceptor phase composition: pH 11.5	47
Fig. 17. Scheme of the microfluidic device a) Not assembled, b) Assembled, c) Analytes transfer model.	50

Fig. 18. Donor flow rate optimization. SLM: 1:1 NPOE:Dodecanol. Donor phase composition: 10 mM phosphate buffer pH 6.5. Acceptor phase composition: 10 mM phosphate buffer at pH 1.5 (basic compounds) and 10 mM phosphate buffer at pH 12 (for acidic compounds). Voltage: 5 V.	51
Fig. 19. Photos of EME equipment. Top left-to-right) sample plate, filter plate, acceptor lid with electrode rods. Bottom left) assembled device. Bottom right) cross-sectional illustration of assembled device configured for extraction of basic analytes.....	55
Fig. 20. Chemical structures of the selected DES components.	56
Fig. 21. Extraction recoveries (%) obtained after 15 min of extraction with different SLM compositions. All extraction were performed in triplicate. The voltage was 75 V for bases and 35 V for acids. The sample solution was 10 mg/mL for both acids and bases	58
Fig. 22. Extraction recoveries (%) obtained after 15 min of extraction with different SLM compositions. All extraction were performed in triplicate. The voltage was 75 V, and the sample solution was 10 mg/mL in 50 mM phosphoric acid pH 2.0.	59
Fig. 23. Scheme of the methodology of microfluidic extraction based in liquid-phase microextraction.	62
Fig. 24. Extraction efficiency versus donor flow rate. SLM: camphor-menthol 1:1, acceptor phase pH 11.5, donor phase pH 2, acceptor flow rate: 1 $\mu\text{L min}^{-1}$	63
Fig. 25. Extraction efficiency versus donor flow rate. SLM: camphor-menthol 1:1, acceptor phase pH 10.5, donor phase pH 2, acceptor flow rate: 1 $\mu\text{L min}^{-1}$	63
Fig. 26. Optimization of sample composition. SLM: 2:1 TBP:DHE, acceptor pH 2, flow rate: 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ (acceptor and sample).	73
Fig. 27. Optimization of acceptor composition. SLM: 2:1 TBP:DHE, sample pH 12, flow rate: 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ (acceptor and sample).	74
Fig. 28. Recovery versus sample flow rate. SLM: 2:1 TBP:DHE, acceptor pH 1.5, sample pH 12. .	75
Fig. 29. Chromatogram of spiked human urine at 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$: (1) TYR, (2) ATN, (3) MTR, (4) VRP, (5) NRP, (6) AMP. a) With microfluidic proceed. b) without microfluidic proceed.....	78

Índice tablas

Table 1. μ EME/HPLC recoveries (average of three determinations \pm standards deviation) from spiked urine samples.	48
Table 2. Extraction efficiencies (average of three determinations \pm standard deviation) from 0.5, 1 and 3 mg L ⁻¹ spiked urine samples and bovine plasma samples.	52
Table 3. Comparison of figures of merit for simultaneous extraction of basic and acidic drugs with other setups.	53
Table 4. SLM solvents selected for testing. Camphor:DL-menthol 2:1 mixture was not liquid at room temperature. The Kamlet-Taft properties were determined experimentally.....	57
Table 5. Evaluation data of polar bases extracted for 20 min at 75 V from human plasma diluted 1:1 with 250 mM phosphoric acid. Repeatability (RSD) and matrix effects (%ME) were evaluated at 50 ng mL ⁻¹	60
Table 6. Recoveries (average of three determinations \pm standard deviation) from 1 mg L ⁻¹ spiked urine samples for decanol and camphor-menthol 1:1 as SLM.....	64
Table 7. Extraction efficiencies (RSD %) of the polar and non-polar basic using different organic solvents as the SLM for μ LPME-chip device.	72
Table 8. . Recoveries (RSD %) of the polar and non-polar basic using different organic solvents as the SLM for μ LPME-chip device.	73
Table 9. Calculated values for K_1 , K_2 , K , and recovery with 1-octanol as SLM.	75
Table 10. Chromatogram of spiked human urine at 2 μ g mL ⁻¹ after submitted to the microfluidic device (A) and without (B). (1) TYR, (2) ATN, (3) MTP, (4) VRP, (5) NRP, (6) AMP.....	80

Abreviaciones

LLE	Liquid-liquid extraction
SPE	Solid phase extraction
SPME	Solid phase microextraction
LPME	Liquid phase microextraction
SDME	Single drop microextraction
PP	Polipropileno
SLM	Supported liquid membranas
HFLPME	Hollow fiber liquid phase microextraction
EME	Electromembrane extraction
LOC	Lab on a Chip
PALME	Parallel artificial liquid microextraction
PVDF	Polivinilideno
PMMA	Polimetilmetracrilato
PTFE	Politetrafluoroetileno
DHE	Diexil eter
TOPO	Óxido de trioctilfosfina
NPOE	2-nitrofenil octil éter
TEHP	Tris-(2-etilhexil) fosfato
HPLC	Cromatografía líquida
CE	Electroforesis capilar
MS	Espectrometría de masas
EE	Eficiencia de extracción
EF	Factor de preconcentración
EIS	Espectroscopía de impedancia

Objetivo

El objetivo principal de esta tesis es la puesta a punto de nuevas plataformas miniaturizadas que sean rápidas, potentes y versátiles, aplicadas al tratamiento de muestra. Para ello se diseñarán, fabricarán y optimizarán sistemas microfluídicos que permitan la extracción de analitos de diversa naturaleza química, tanto analitos ácidos como básicos, polares y no polares, en matrices complejas. Estas plataformas deberán permitir la extracción de una o varias familias de analitos, utilizando para ello tantos dispositivos sencillos (una sola extracción al mismo tiempo) o dobles (de dos extracciones simultáneamente), adaptados a la técnica de microextracción en fase líquida (LPME) y electromembrana (EME). De esta manera, se pretende desafiar la limitada versatilidad de la extracción simultánea de compuestos de diversa índole, compatibles a su vez hacia la “química verde”. Asimismo, se plantea como objetivo la optimización individual de cada uno de los parámetros fundamentales que rigen la extracción, según la naturaleza del analitos o analitos a extraer. Estos parámetros son geometría del dispositivo, membrana líquida soportada, composición de las fases aceptora y donadora, voltaje (en el caso de dispositivos adaptados a la EME) y caudales donador y aceptor.

Además, dentro de estos objetivos, se llevará a cabo un estudio exhaustivo de la selección de la membrana líquida soportada (de naturaleza orgánica), considerada parámetro crítico en la optimización de estos dispositivos con el objetivo de conseguir sistemas ecológicos empleando solventes sostenibles de origen natural y biodegradables. La aplicación de estos nuevos solventes pretende alcanzar una gran expectación en la extracción de analitos de distintas polaridades de manera simultánea, gracias al estudio de las diferentes interacciones que se dan en el analito-solvente.

Otros de los objetivos que se presenta en esta tesis es la caracterización de un dispositivo microfluídico sencillo adaptado a EME a través de la técnica de espectroscopía de impedancia. Con esta caracterización se pretende alcanzar una profunda comprensión de los fenómenos de transporte de masas y cargas, así como también, los procesos electroquímicos que se producen en la interfase de la membrana. De esta manera, se podrá optimizar el sistema completo de

extracción de manera exhaustiva, prediciendo los mejores rendimientos de extracción reduciendo el número de experimentos necesarios para completar la optimización y por consiguiente, reducir también tiempo de análisis y costes.

Objective

The main goal of this thesis is the development of new quick, powerful and versatile miniaturised platforms applied to sample treatment. For this purpose, microfluidic systems will be designed, manufactured and optimised to enable the extraction of analytes of diverse chemical nature, both acidic and basic, polar and non-polar, in complex matrices. These platforms shall allow the extraction of one or several families of analytes, using single devices (one extraction at the same time) or double devices (two extractions simultaneously), adapted to the liquid phase microextraction (LPME) and electromembrane (EME) technique. This way, the aims are to overcome the limited versatility of the simultaneous extraction of compounds of very different nature and to move also towards "green chemistry". It also aims at the individual optimisation of each of the fundamental parameters governing the extraction, depending on the nature of the analyte(s) to be extracted. These parameters are the geometry of the device, the supported liquid membrane, the composition of the acceptor and donor phases, the voltage (for EME adapted devices) and the donor and acceptor flow rates.

In addition, within these objectives, an exhaustive study of the selection of the supported liquid membrane (of organic nature) which is a critical parameter in the optimisation of these platforms, will be carried out. The aim of this objective is to achieve environmentally friendly systems using sustainable solvents of natural and biodegradable origin. The application of these new solvents intends to achieve a great expectation in the extraction of different polarities analytes in a simultaneous way, thanks to the study of the different analyte-solvent interactions.

Another of the objectives presented in this thesis is the characterisation of a single device (adapted to EME) by impedance spectroscopy. The aim of this characterisation is to obtain for the first time, a deep understanding of the mass and charge transport phenomena, as well as the electrochemical processes occurring at the membrane interface. Therefore, the complete extraction system can be optimised in a comprehensive way. With this characterisation, it will be possible to predict the best extraction throughput, reduce the number of experiments needed to complete the optimisation and consequently also reduce analysis time and costs.

Introducción

1. Introducción

Introducción

La determinación de analitos a baja concentraciones en matrices complejas (tales como muestras biológicas o medioambientales) presenta hoy en día un gran desafío. Esto es debido a que compuestos mayoritarios al analito presentes en la matriz, enmascaran la señal de este en el análisis. Para minimizar este fenómeno denominado “efecto matriz”, previamente al análisis, se realiza un tratamiento de muestra, que en rangos generales se basa en la eliminación o disminución de las señales de cualquier sustancia que enmascare a la del analito. Debido a la importancia que tiene este paso en el análisis, el pretatamiento de muestras se ha convertido hoy en día en una de las ramas principales dentro de la química analítica moderna. [1,2]

Los procedimientos para el tratamiento de muestras y las metodologías de análisis están en continua mejora, enfocados principalmente en desarrollar herramientas de análisis más rápidas, potentes y versátiles. La sofisticación y la capacidad del análisis cuantitativo y cualitativo de la metodología actual contrastan con la lentitud y laboriosidad de los procedimientos de tratamiento de muestra convencionales. Estas últimas, presentan numerosas desventajas como un elevado consumo de tiempo, de muestra y de reactivos, que en algunos casos son caros y/o tóxicos, generando pérdidas económicas con frecuencia [3].

En los últimos años, la miniaturización y automatización de las técnicas analíticas se está convirtiendo en una tendencia dominante, ya que elimina las limitaciones presentadas por las tecnologías de análisis actuales [4]. En este sentido, los dispositivos microfluídicos presentan numerosas ventajas frente a la preparación de muestra tradicionales, ya que minimizan la cantidad de muestra requerida, así como el consumo de reactivos y de disolventes caros y tóxicos, contribuyendo a las líneas actuales enfocadas hacia una “Química Verde”[5]. En la literatura reciente queda demostrado que estos dispositivos son capaces de alcanzar resultados con alta selectividad, sensibilidad, sin efecto matriz y reducidos tiempos de análisis, además de permitir su acoplamiento on-line a instrumentos de análisis convencionales. [6,7]

Introducción

1.1. Técnicas de extracción

La extracción líquido-líquido (liquid-liquid extraction, LLE), con excepción de la lixiviación, es la técnica convencional más antigua de extracción con disolventes. Esta técnica es sencilla y versátil, por lo que posiblemente sea la técnica de preparación de muestras acuosas más aceptada generalmente. [1] Sin embargo, la LLE convencional presenta numerosos inconvenientes, como tiempos de análisis demasiados prolongados, por no hablar del consumo excesivo de disolventes orgánicos. Esto implica elevados costes al emplear la técnica de manera continua, además, desechar estos disolventes afecta enormemente al medioambiente. Cabe añadir que la selectividad de la técnica es reducida ya que, con frecuencia componentes de estructura parecida al analito de interés son extraídos, sin conseguir anular el efecto matriz durante el análisis

Como solución a estos inconvenientes, a finales de la década de los 70 surge la SPE (solid phase extraction, SPE) como una evolución de la LLE. Esta técnica es considerada como una versión miniaturizada de la cromatografía líquida, basándose en la retención selectiva de los analitos en muestras acuosas al pasar por una fase estacionaria. Aunque esta técnica reduce el gasto de disolventes empleados, presenta la desventaja de que algún componente de la matriz impida o dificulte la interacción entre el analito y el solvente, ocasionando bajas recuperaciones. [3,4]

Como evolución de estas técnicas clásicas, en 1990 se introduce la microextracción en fase sólida (solid phase microextraction, SPME). [5] La SPME se basa en la miniaturización de la SPE, utilizando una fibra de sílice fundida recubierta de un sólido adsorbente para extraer y preconcentrar los compuestos de interés. Esta técnica constituye un avance significativo, presentando numerosas ventajas como la simplicidad del uso, la automatización, el bajo consumo de materiales, la eliminación de disolventes y tiempos de operación más cortos. Sin embargo, la dificultad a la hora de manipular la fibra hace que con frecuencia quede dañada, causando una baja reproducibilidad. [6, 7]

El auge por procesos cada vez más miniaturizados y amigables con el medioambiente provocan, que las nuevas corrientes de investigación en el tratamiento de muestras se enfoquen

Introducción

en técnicas de microextracción. Bajos estos pretextos, surge la microextracción en fase líquida (liquid phase microextraction, LPME), que básicamente es una versión miniaturizada de la LLE [12]. En estos sistemas, los analitos pasan desde una fase acuosa donde se encuentra la muestra, hasta la fase aceptora (acuosa u orgánica) a través de una membrana líquida que actúa como barrera selectiva.

La capacidad de poder usar pequeños volúmenes durante la extracción, el empleo de únicamente unos microlitros de disolvente, tiempos de extracción reducidos y conseguir fácilmente un sistema reproducible y eficiente, provocaron que esta técnica se popularizase rápidamente. Además, una elevada relación entre los volúmenes de las fases (aceptora y donadora) permite obtener altas preconcentraciones, es decir una excelente sensibilidad [4,13]. En el apartado 1.1.1. se profundiza más en detalle sobre esta técnica. Tras el apogeo de la LPME, en 1996 surge la microextracción en gota (single drop microextraction, SDME) desarrollado por Liu y Dasgupta [14] junto con Jeannot y Cantwell [15]. Se trata de una técnica sencilla y de bajo coste, donde la exposición a disolventes orgánicos tóxicos es mínima. Las desventajas de esta técnica son los elevados tiempos de extracción e inestabilidad del sistema, debido a posibles pérdidas de las gotas suspendidas durante la agitación de las muestras [16].

Para abordar el problema de la inestabilidad, en 1999 S. Pedersen-Bjergaard y K.E. Rasmussen [17], introdujeron barreras selectivas en forma de fibras huecas de polipropileno. Estas fibras porosas actúan como soporte del disolvente y fueron denominadas “membranas líquidas soportadas” (supported liquid membranes, SLM). En estos sistemas, el disolvente orgánico se encuentra impregnado en los poros de una fibra hueca y la muestra se encuentra en contacto con esta membrana líquida soportada o extractante. El analito de interés es extraído desde la muestra (o fase donadora) hacia la aceptora (lumen de la fibra hueca) atravesando la membrana líquida soportada que actúa de barrera selectiva. Bajo estos pretextos y bajo las bases establecidas por G. Audunsson [18] y E. Thordarson [19], se desarrolla la microextracción en fase líquida usando fibras huecas (hollow fiber liquid phase microextraction, HFLPME). En esta técnica, la extracción se

Introducción

consigue gracias al fenómeno de difusión que da lugar desde la muestra (fase donadora) hacia la fase aceptora, gracias a un gradiente de pH entre ambas fases.

La principal desventaja que presenta esta técnica es la baja velocidad de difusión, implicando elevados tiempos de extracción a pesar del agitado de la muestra; especialmente en analitos polares [20]. Para intentar mejorar el transporte de los analitos, principalmente en analitos polares se añade un tercer componente llamado *carriers* o transportadores, que solo afecta a la cinética de la reacción, creando una molécula neutra o par iónico que facilita el transporte de masas [21–23].

En 2006, Pedersen-Bjergaard y Rasmussen desarrollan una nueva variante similar a la LPME: extracción mediante electromembrana (electromembrane extraction, EME) [24]. En esta modalidad, a diferencia de la LPME, la extracción se lleva a cabo gracias a una diferencia de potencial existente entre la muestra (fase donadora) y la fase aceptora, generando un campo eléctrico entre ambas fases. Para ello, se sumerge un electrodo en cada una de las fases y se aplica una diferencia de potencial. Se ha observado que para determinados analitos, el campo eléctrico facilita el transporte a través de la membrana líquida soportada, reduciendo los tiempos de extracción de los analitos gracias a la electromigración [25,26]. En esta técnica, el disolvente empleado como SLM debe ser además conductor. En el apartado 1.1.2 se abarca en profundidad en esta técnica.

En 2010 [24], se diseñó y desarrolló por primera vez una plataforma microfluídica adaptada a la extracción por EME. Con este nuevo diseño, el grupo de investigación dirigido por Pedersen-Bjergaard abre una línea puntera basada en el concepto “*Lab on a Chip*” (LOC). LOC es una tecnología donde son integradas varias funciones propias de un laboratorio en una única plataforma de tamaño reducido, permitiendo la posibilidad de manejar volúmenes muy reducidos, tanto de muestra como de químicos de alta toxicidad [25]. Junto a esta revolucionaria tecnología se incorpora un nuevo concepto, membranas planas, que harán de soporte del disolvente orgánico, sustituyendo a las membranas huecas convencionales en estos dispositivos.

Introducción

Finalmente, Gjelstad *et al.*[26] introducen un nuevo formato al que denominaron PALME (parallel artificial liquid microextraction, PALME). Este dispositivo consta de 96 pocillos que descansan sobre una placa de aluminio donde se deposita la fase donadora. La fase aceptora se encuentra en una placa de plástico con otros 96 pocillos que es sobrepuesta a la placa donadora. Estas dos fases están separadas por la membrana líquida, la cual es soportada por unas láminas planas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). De esta manera, se introduce un nuevo concepto que permite realizar muchas extracciones simultáneamente. En la variante de EME, los departamentos donde se deposita las muestras contienen 96 electrodos de aluminio (por cada fase) que hacen posible la electromigración. La principal ventaja que tiene este dispositivo es que es posible realizar muchas extracciones simultáneamente [27–29]. En la Fig. 1, se recoge un esquema evolutivo de la LLE hasta PALME. En la última década, estas técnicas se han ido desarrollando hacia la miniaturización y la automatización dando lugar a sistemas microfluídicos que implementan ambas técnicas (tanto LPME como EME) con el fin de disminuir significativamente el volumen de disolvente orgánico y reactivos, el volumen de muestra y el tiempo de extracción [30]. De manera homóloga, se ha ido innovando en el desarrollo de membranas de distintos tipos de materiales más ecológicos y compatibles con el medioambiente, con el objetivo de sustituir las membranas de PP. Hasta la fecha, se han conseguido importantes avances en membranas de gel de agar o agarosa tanto en LPME como en EME [31]. Estas membranas de gel son completamente biodegradables y gracias a las ventajas que se han comentado en líneas anteriores, favorecen el desarrollo de estas técnicas de microextracción hacia aplicaciones amigables con el medioambiente, tan necesarias actualmente.

Introducción

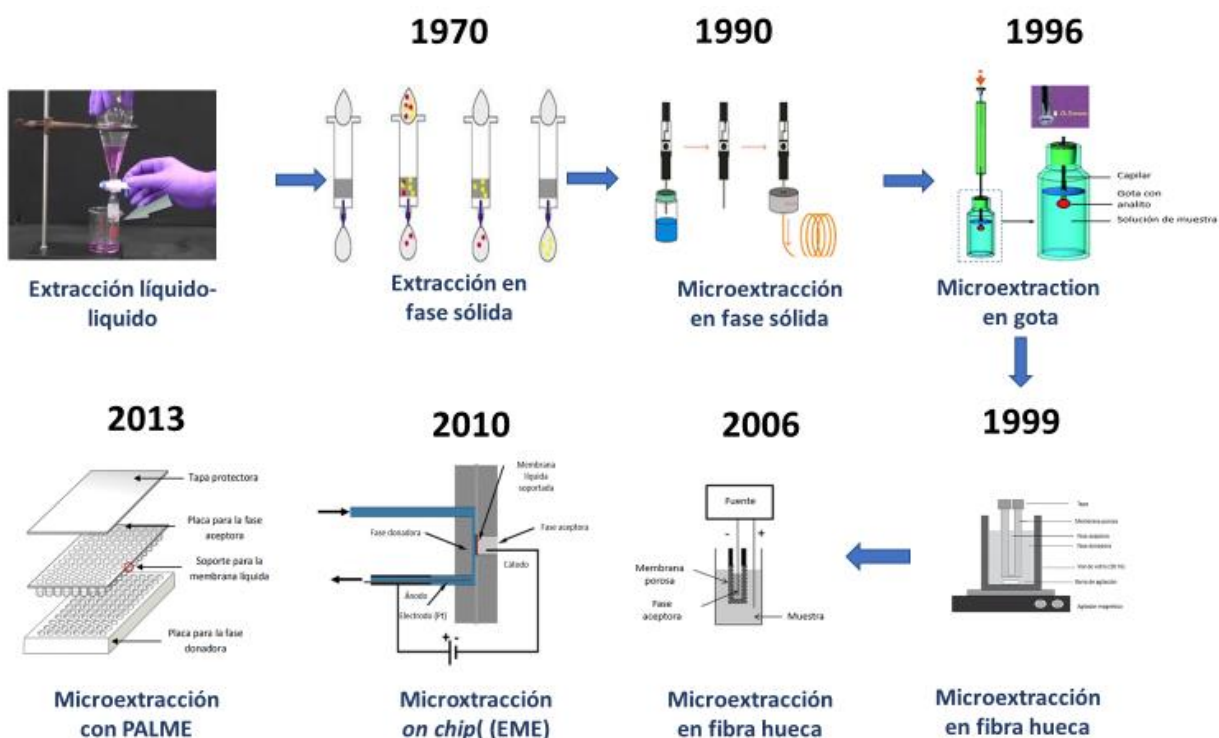


Fig. 1. Esquema evolutivo de las técnicas de extracción.

1.1.1. Microextracción en fase líquida (LPME)

Como se ha mencionado anteriormente, la LPME se consigue gracias a una difusión pasiva debido a un gradiente de pH entre la fase donadora y la fase aceptora. De esta manera, los analitos de la fase donadora (en su forma neutra) atraviesan la membrana líquida hacia una fase aceptora, en la cual los analitos se encuentran cargados positiva o negativamente, dependiendo de la naturaleza del analito básico o ácido, respectivamente. Además, esta técnica se ha desarrollado en dos modalidades, según la naturaleza de la fase aceptora: [32]

- LMPE en dos fases** (Fig. 2a): en esta modalidad los analitos atraviesan la membrana líquida soportada (de naturaleza orgánica) desde una fase acuosa hacia una fase aceptora de la misma naturaleza que la membrana, donde permanecen neutros, dando lugar a una interfase entre la fase acuosa y el disolvente. Esta técnica se emplea principalmente en

Introducción

análisis que requieran de un disolvente orgánico o evaporación del solvente que contenga la muestra, como es la cromatografía de gases. La cinética de la reacción dependerá del coeficiente de reparto ($\log P$) del analito entre la fase acuosa y fase orgánica. Además, la elección propiedades disolvente dependerá de la naturaleza del analito, teniendo en cuenta parámetros como la polaridad o la inmiscibilidad del disolvente en agua [33,34].

- b) **En la modalidad de tres fases** (Fig. 2b): los analitos se extraen desde una fase donadora (acuosa) hacia la fase aceptora también acuosa, atravesando la SLM (de naturaleza orgánica) y formando dos interfaces. Como en la modalidad anterior, la velocidad de difusión dependerá del coeficiente de repartición analito-interfaces, pero además de la composición (o diferencia de pH) de la muestra y de la fase aceptora. Los analitos, en su forma neutra, serán extraídos hacia la fase aceptora (en su forma ionizada) favoreciendo el no retroceso de los analitos hacia la muestra. Los analitos deben estar cargados negativa o positivamente en la fase donadora si se desea extraer compuestos ácidos o básicos, respectivamente. Esta modalidad de trabajo es principalmente empleada para extraer analitos ácidos o básicos en muestras acuosas, compatibles con técnicas de análisis como la cromatografía líquida o electroforesis capilar. [35,36]

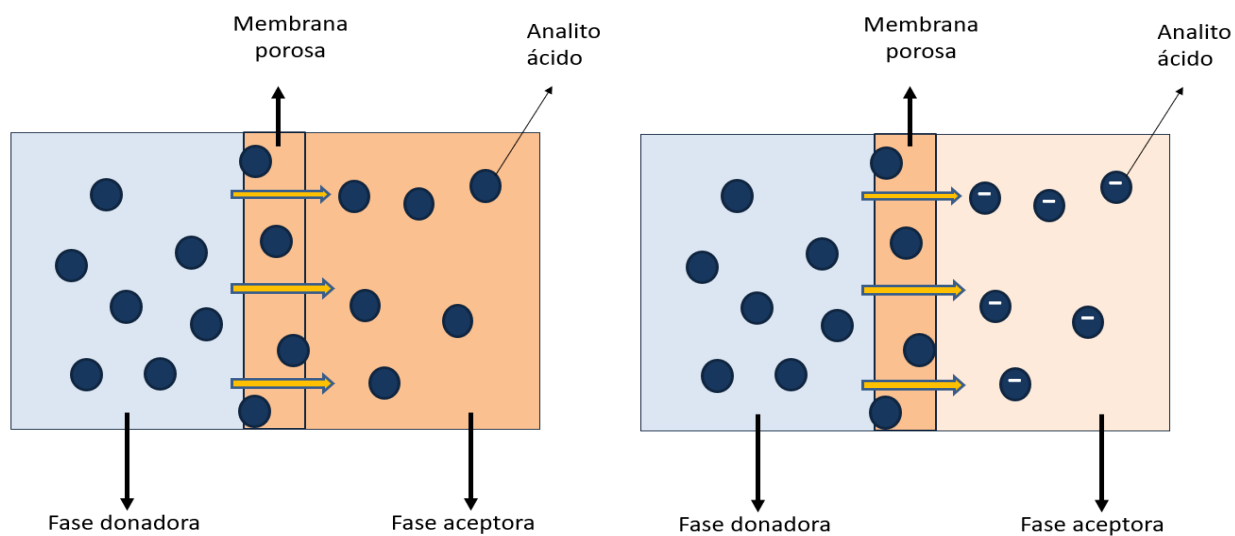


Fig. 2. a) Esquema de modalidad LPME en dos fases. b) Esquema de modalidad LPME en tres fases

Introducción

1.1.2. Microextracción mediante electromembrana (EME)

La extracción mediante EME (Fig.3) es similar a la de LPME, a excepción de la adición de dos electrodos en cada una de las fases. En esta técnica, la dirección del campo eléctrico generado al aplicar una diferencia de potencial entre los dos electrodos, es seleccionado en función a la naturaleza ácida o básica del compuesto de interés. Para ello, los analitos se deben encontrar ionizados en ambas fases y son impulsados por una nueva componente, la electromigración, que favorece la cinética (junto a la difusión) de la extracción a favor de la dirección del campo aplicado [37]. Para la extracción de analitos ácidos o básicos, se coloca en la fase aceptora el electrodo positivo y negativo, respectivamente.

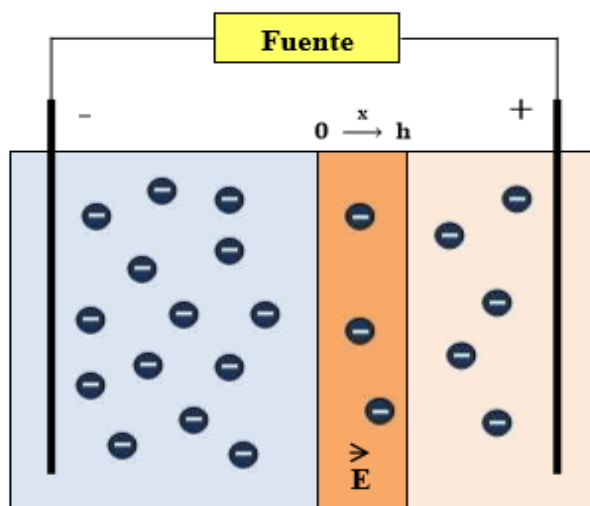


Fig. 3. Esquema de EME mediante electromigración para analitos ácidos.

Al añadir la componente eléctrica a estos sistemas de extracción, se abren nuevas oportunidades para extraer diferentes compuestos con mucha mejor sensibilidad y tiempos de extracción notablemente menores. El efecto matriz es muy reducido en la EME al incorporar a todos los beneficios de la LPME (barreras físicas, elección del disolvente según las necesidades de

Introducción

extracción, etc) un campo eléctrico dirigido, que permite retener en la fase donadora muchos compuestos como proteínas o sales [38–40]. Esta técnica, además, aporta un plus en la selectividad, ya que no solo nos permite elegir entre compuestos aniónicos o catiónicos, sino que, al poder controlar la magnitud del campo aplicado, se pueden extraer compuestos según su polaridad [41]. Algunos estudios han demostrado que la extracción para analitos de baja polaridad o una sola carga es más eficiente a voltajes bajos; mientras que a voltajes altos, se ve favorecida la extracción de compuestos con mayor carga [42].

1.2. Dispositivos microfluídicos

En las últimas décadas está cobrando cada vez más importancia la tendencia de desarrollar plataformas que permitan integrar sistemas de microextracción. Estas plataformas denominadas sistemas microfluídicos permiten la extracción de compuestos empleando solo unos microlitros de muestra, lo que implica un menor consumo de reactivos frente a sistemas tradicionales de tratamiento de muestras. Estos sistemas de reducidas dimensiones dan la posibilidad de ser transportados fácilmente, permitiendo acoplar el dispositivo online a instrumentos de análisis [1,43].

La rápida evolución de estos dispositivos es en parte a los materiales empleados en su fabricación. En sus inicios, metales como el aluminio o titanio eran los principales protagonistas, por lo que la manufacturación y costes eran bastantes elevados. Hoy en día materiales muchos más asequibles como el polimetilmetacrilato (PMMA) o el policarbonato, reducen los costes significativamente [1,43,44]. En la última década, las técnicas populares de extracción anteriormente descritas, como son la LPME y la EME, han sido miniaturizadas y satisfactoriamente integradas en sistemas microfluídicos enfocados al tratamiento de muestra, tanto para aplicaciones biológicas como medioambientales [45–50].

Introducción

El primer dispositivo microfluídico basado en una modalidad en tres fases de LPME es desarrollado por Audunsson *et al.* en 1986. [15] Estos investigadores, presentan un dispositivo formado por dos bloques individuales de titanio, los cuales contienen dos canales microfluídicos (uno para fase donadora y otro para la aceptora) separados por una membrana plana de politetrafluoroetileno (PTFE), en la cual se impregna el disolvente orgánico (Fig. 4a). En 1992, Jönsson y sus colaboradores desarrollaron un nuevo dispositivo con canales en forma de espiral (Fig. 4b) [51]. Dos años más tarde [7], estos mismos autores simplificaron su diseño cilíndrico inicial por uno lineal, dando lugar a un dispositivo formado por dos bloques simétricos de PVDF conteniendo cada uno un canal, encontrándose enfrentados y separados por la SLM (Fig. 4c).

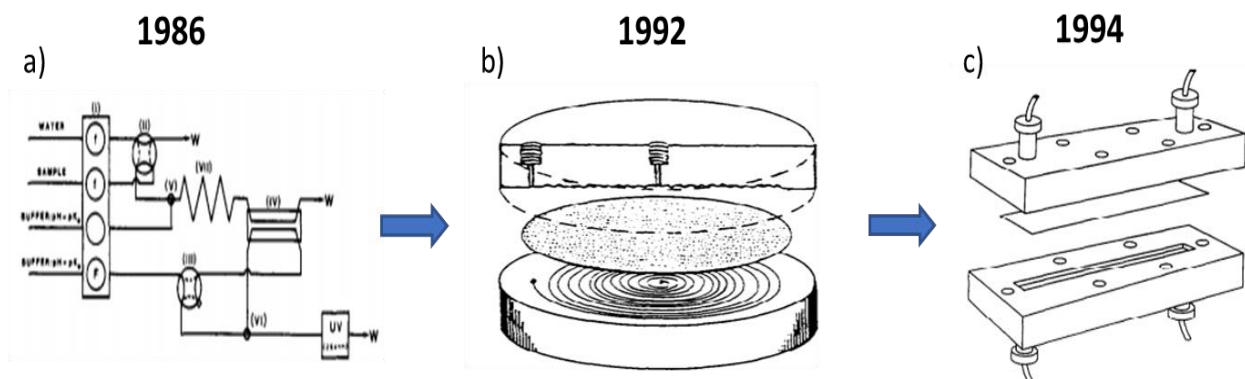


Fig. 4. Primeras miniaturizaciones microfluídicas basados en LPME en tres fases. A) En 1986. B) En 1992. C) En 1994

Es en el año 2000 cuando se desarrolla el primer dispositivo basado en LPME en dos fases [52]. Este dispositivo contenía canales microfluídicos (0.1mm de profundidad) en forma de Y para contener la disolución orgánica y acuosa, ambas por separado (Fig. 5). Estas disoluciones recorren el canal por capilaridad hasta una intersección Y, punto en el que ambas fases se encuentran y se produce la extracción. Sin embargo, una de las limitaciones de este dispositivo es la poca eficiencia y reproducibilidad que presenta. Estos sistemas miniaturizados aplicados al tratamiento de

Introducción

muestra han ido desarrollándose, aumentando su popularidad hasta la actualidad, donde podemos encontrar diseños y dispositivos muy diferentes que ofrecen elevadas eficiencias de extracción o buenos factores de enriquecimiento, bien basados en LPME [53,54] o EME [55,56].

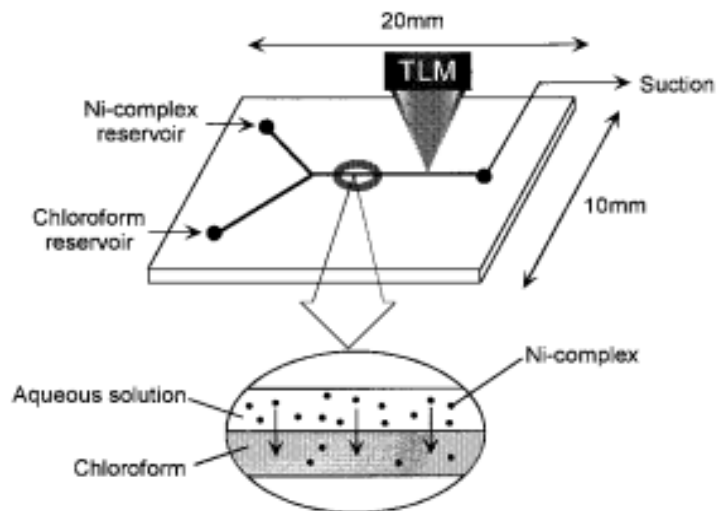


Fig. 5. Primer dispositivo microfluídico basado en LPME en dos fases (2000).

En 2005, Wang *et al.* [57] empleó dispositivos de policarbonato con diferentes dimensiones y profundidades en los canales correspondientes para la fase donadora y aceptora. En este caso, emplearon una membrana líquida soportada de diétil éter al 5% de TOPO (óxido de trioctilfosfina), observando que los factores de enriquecimiento incrementaban a menor profundidad de los canales, mejorando así el contacto entre la membrana y dichas fases.

En 2010 [58], Petersen *et al.* desarrollan por primera vez una versión miniaturizada de la EME (Fig. 6a)), empleando como material el PMMA, considerado un material transparente ligero y barato. Como se ha comentado previamente, la electromembrana lleva dos electrodos incorporados en cada una de las fases para generar una diferencia de potencial; y para ello, estos investigadores incorporaron hilos de platino de 0.076 mm de diámetro en las salidas del canal

Introducción

donador y aceptor. Este dispositivo estaba compuesto por dos capas simétricas de PMMA, conteniendo cada una de ellas 5 canales individuales de 6 mm de largo, 2 mm de ancho y 0,05 mm de profundidad. La membrana de polipropileno es colocada separando los canales aceptores y donadores previamente al sellado del dispositivo y posteriormente, la membrana es impregnada (empleando 2-nitrofenil octil eter, NPOE) antes de la extracción. Tanto la fase donadora (o muestra) como la fase aceptora, son impulsadas hacia el interior del canal donador y aceptor, respectivamente, empleando unos tubos de PTFE de 0.5 mm de diámetro interno. Finalmente, los electrodos de platino son conectados a una fuente de alimentación, generando así un campo eléctrico entre ambas fases, gracias al cual los analitos (presentes en la fase donadora) electromigran hacia la fase aceptora a través de la membrana. Este dispositivo fue empleado en primer lugar para extraer analitos básicos en muestras de orina, obteniendo como resultado altas eficiencias y buen “*clean-up*”. No obstante, el dispositivo estaba sellado y no permitía la reutilización de estos canales para nuevas extracciones, ya que la membrana no podía ser reemplazada; siendo esto por tanto, una de sus principales inconvenientes.

Durante los siguientes años, cada vez son más el número de investigadores que se suman a la línea de la miniaturización de la LPME y/o EME utilizando membranas planas. De hecho, el PMMA se ha convertido en un material de fabricación en sistemas de extracción muy empleado debido no solo a las ventajas que éste presenta, sino porque ha demostrado ser muy versátil y reutilizable. Numerosas aplicaciones se han centrado en la extracción de un solo analito o familia de analitos de similares características, dirigidas tanto muestras biológicas, farmacéuticas como medioambientales [59–64]. Además, estos dispositivos han demostrado ser una alternativa atractiva para análisis online, permitiendo así su acoplamiento directo a equipos de análisis como HPLC, de manera sencilla y reduciendo el tiempo de análisis (Fig. 6b) [65]. Estas plataformas microfluídicas ofrecen elevadas eficiencias de extracción, gracias a que la transferencia de masas, que es acelerada tras la miniaturización de los canales, permite un mayor y mejor contacto entre la muestra y la membrana. Sin embargo, las condiciones de doble flujo continuo en ambas fases no permiten obtener altos factores de enriquecimientos; convirtiéndose en una de las desventajas

Introducción

de estos sistemas; especialmente, cuando se pretende aplicar a muestras en los que los analitos de interés se encuentran en concentraciones muy bajas, como puede ser el caso de muestras medioambientales. Esta desventaja fue resuelta por el grupo de Yamini, enfocado en el desarrollo de nuevas geometrías en los canales de dispositivos microfluídicos aplicados al tratamiento de muestra. En este caso, la extracción se llevó a cabo en condiciones estacionaras con una geometría de canales diferentes implementando la técnica EME, consiguiendo factores de enriquecimiento del orden de 12-17 (Fig.6.c). Además, incorporaron una ventaja respecto a los dispositivos anteriores, permitiendo la reutilización del dispositivo mediante el sellado de éste con tornillos externos, de tal manera que la membrana podía ser reemplazada para nuevas extracciones. A pesar de que estas modificaciones permiten obtener buenos resultados propuestos en términos de enriquecimiento; el tiempo de extracción y el volumen de muestra necesario bajo estas condiciones son más elevados, afectando a unas de las principales características de la microextracción *on-chip*: rápidas extracciones y reducido volumen de muestra [64].

De manera paralela, Ramos-Payán M. *et al.* estudió y puso a punto nuevos procedimientos de extracción con el objetivo de extraer simultáneamente compuestos de diferentes familia y/o naturaleza. Hasta entonces, una de las ventajas de la LPME y EME era la selectividad para extraer analitos de naturaleza similar en una sola extracción. Sin embargo, poner a punto nuevas metodologías minaturizadas de manera selectiva para compuestos de diferente naturaleza supuso un nuevo desafío. Se desarrolló un nuevo sistema microfluídico implementando LPME para la extracción simultanea de dos familias de compuestos diferentes (Fig. 6d) [60], comparando además eficiencias y enriquecimientos bajo dos condiciones diferentes de trabajo: en continuo y semicontinuo (o estacionario). Se observó que bajo condiciones de doble flujo o condiciones semicontinua, se obtenían altas eficiencias de extracción o altos enriquecimientos, respectivamente. Además, el tiempo de extracción y el volumen de muestra requerido eran inferiores al necesario para llevar a cabo extracciones en modo semicontinuo.

Introducción

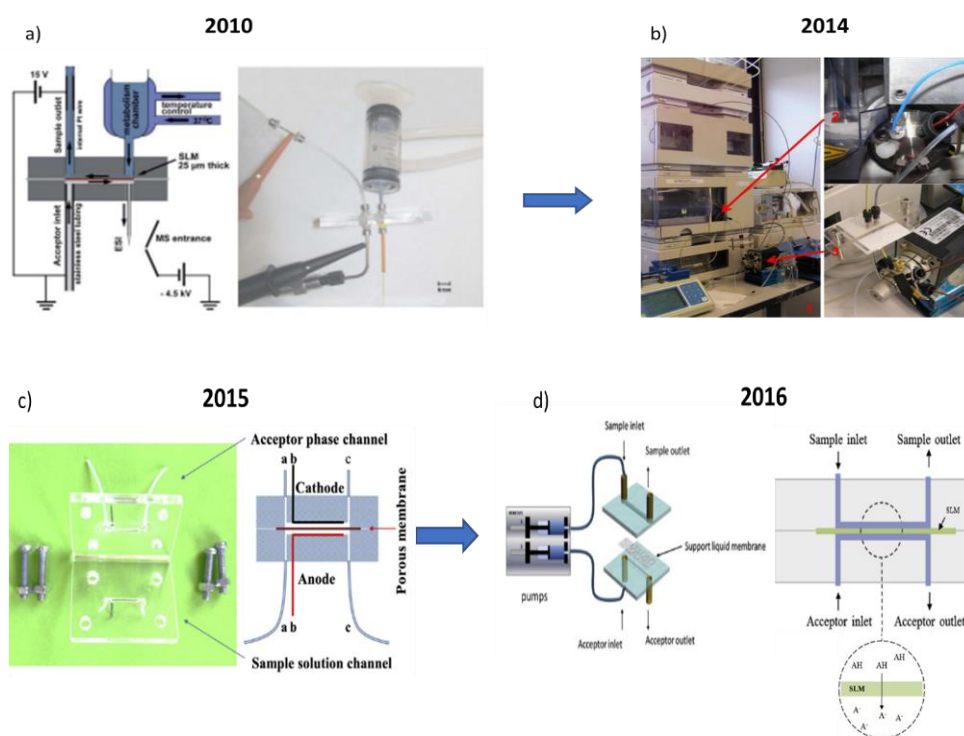


Fig. 6. Evolución de la técnica EME y LPME *on-chip* (3 fases). a) En 2010. b) En 2014. c) En 2015. d) 2016

Estos dispositivos han demostrado ser una alternativa atractiva para la extracción rápida y eficiente de compuestos de diferente naturaleza mediante una misma técnica; no obstante, analitos de estructura y polaridad muy diferente con grupos ácidos y básicos presentaban incompatibilidad mediante una misma técnica. Diferentes investigadores probaron con diferentes diseños y metodologías en *set-up* tradicionales (no miniaturizada, como por ejemplo el uso de fibra hueca), donde se combinaba la LPME/EME o doble EME para conseguir la extracción de analitos ácidos y básicos; y aunque se consiguieron extraer estos analitos de manera separada, los volúmenes y tiempos de extracción empleados en estos *set-up* eran altos, alrededor de los 600 μL y 15 minutos, respectivamente. Además, las eficiencias obtenidas en el proceso eran bajas y no permitían realizar extracciones consecutivas [66–69]. En 2016, Yamini *et al.*, propusieron conectar de manera externa dos dispositivos miniaturizados individuales para aplicar dos EME, uniendo la salida de la muestra de uno de los dispositivos con la entrada de muestra del otro dispositivo

Introducción

individual (Fig. 7a). En cada uno de los dispositivos individuales es impulsada una fase aceptora con un pH optimizado diferente, para favorecer la extracción del analito en función de si es de naturaleza básica o ácida. Este dispositivo requería trabajar bajo condiciones de flujo estacionario, para poder alcanzar una buena preconcentración de la muestra, implicando mayor consumo de muestra y tiempos de extracción superiores a 40 minutos [70].

Esto no dejó de ser un desafío para la miniaturización, por lo que Ramos-Payán *et al.*, propusieron y diseñaron un nuevo sistema miniaturizado, con el objetivo de implementar simultáneamente dos de las técnicas más populares de microextracción hasta la fecha (LPME y EME) en un solo microchip, para extraer simultáneamente analitos ácidos y básicos con alta eficiencia de extracción, bajos volúmenes de muestra, sin sacrificar los bajos tiempos de extracción que ofrecía los sistemas microfluídicos miniaturizados. Este dispositivo (2018) permite combinar cualquier posibilidad de las técnicas EME o LPME, es decir: EME-LPME, EME-EME o EME-LPME (Fig. 7b) [71]. La principal diferencia que marcó este revolucionario diseño es que solo existe una única plataforma microfluídica, eliminando la necesidad de utilizar equipos y conexiones externas. En el trabajo publicado por Ramos *et al.* esta nueva plataforma es adaptada y probada en un sistema doble EME/LPME con el que se consigue eficiencias próximas al 100%, además permite combinar los canales microfluídicos en función a la necesidad requerida, por ejemplo, dos fasesceptoras y una donadora común o viceversa) [71]. Este diseño proporcionó la versatilidad de extraer compuestos de diferente naturaleza de manera simultánea procedentes de distintas muestras o, por lo contrario, la extracción en distintas fasesceptoras de compuestos ácidos y/o básicos procedente de una misma muestra común. Posteriormente, esta misma idea fue desarrollada por Yamini para emplear el dispositivo con EME/EME en condiciones estacionarias permitiendo buenos factores de enriquecimiento (Fig. 7c) [66]. Simultáneamente, este dispositivo de doble EME/EME es mejorado por Ramos-Payán en términos de eficiencia de extracción, reproducibilidad y homogeneización de campo [72].

Introducción

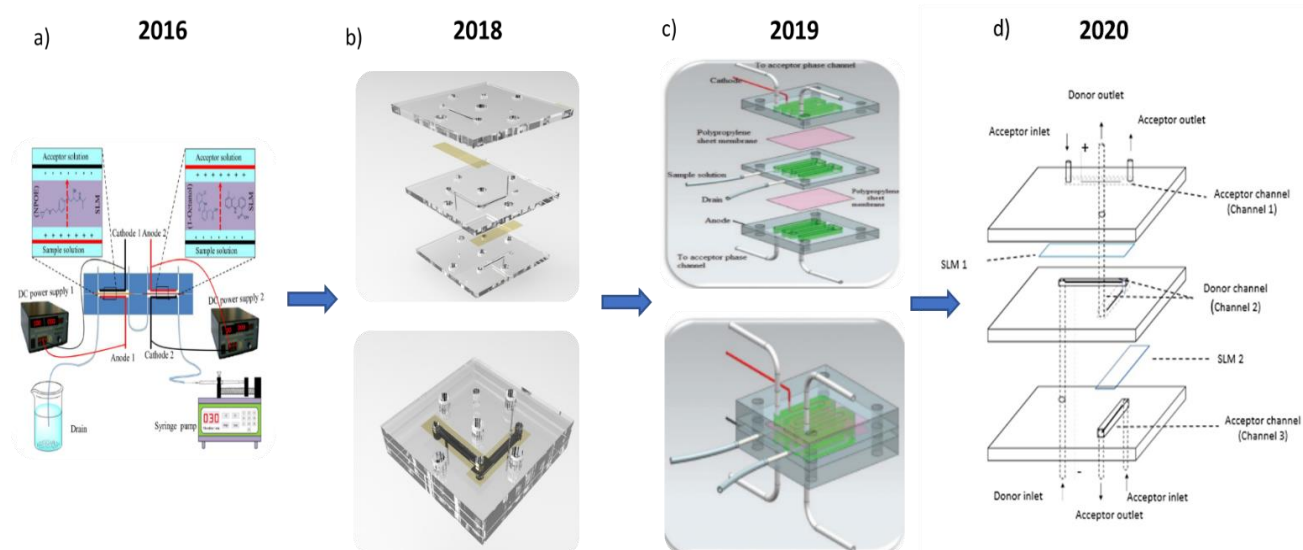


Fig. 7. Evolución de un dispositivo LPME/EME on chip (3 fases). a) En 2016. b) En 2018. c) 2019

1.2.1. Parámetros operacionales que influyen en el procedimiento de LPME y EME en dispositivos microfluídicos.

Teniendo en cuenta los fundamentos teóricos descritos en el punto 1.1.2 y 1.1.3 que rigen la LPME y EME respectivamente, resulta lógico pensar que la eficiencia y rendimiento de la extracción es afectada por una serie de determinados parámetros. Por otra parte, es fundamental alcanzar los niveles adecuados de reproducibilidad, repetitividad y robustez que rige el marco analítico en pretratamiento de muestras y análisis. Con el fin de obtener los objetivos mencionados, es necesario conseguir un sistema estable en estas plataformas microfluídicas, debiéndose optimizar los siguientes parámetros operacionales: la SLM, la composición y el caudal de las fases aceptora y donadora, la geometría del dispositivo y el voltaje aplicado para el caso de la EME [73].

Introducción

1.2.1.1. Membrana líquida soportada (SLM)

En las técnicas LPME y EME, el disolvente orgánico añadido se queda inmovilizado entre los poros de la membrana, formando la SLM, que actúa como una barrera selectiva. La elección adecuada del disolvente orgánico, que debe ser selectivo y ofrecer altas recuperaciones, es una pieza clave a la hora de tener éxito en la extracción, principalmente si se parte de matrices complejas [74,75]. Existen una serie de requisitos que debe cumplir el disolvente orgánico empleando para formar la membrana líquida soportada [76]:

- Tener una baja miscibilidad o nula con el agua, para poder formar correctamente las interfases.
- Ser líquido a temperatura ambiente y tener baja volatilidad.
- Tener baja viscosidad para facilitar el transporte de los analitos cuando atraviesan la SLM.
- Ser compatible con el material de la plataforma, evitando la rotura de esta.
- Un punto de ebullición adecuado para evitar la evaporación del disolvente bajo las condiciones seleccionadas y así mantener la estabilidad del sistema.
- Que permita establecer interacciones iónicas con los compuestos (enlaces dipolo-dipolo y/o puentes de hidrógeno)
- En el caso de la EME, es necesario además, que el disolvente tenga buena conductividad. Para que el sistema de electromembrana permanezca estable es necesario que la membrana líquida junto a las dos fases acuosas forme un circuito eléctrico, que facilite la electromigración de las especies hacia el polo opuesto de la carga del analito, sin llegar a corrientes elevadas [75,77].

Por otro lado, la naturaleza de los compuestos de interés también influye en la elección del disolvente ya que, los analitos seleccionados tienen que ser miscibles con la membrana para poder llegar hasta la fase aceptora. Para esta selección lo más recomendable es seguir el modelo de solvatocrómicos de Kamlet y Taft α , β , π^* . Donde α es la acidez de enlace de hidrógeno, β es la basicidad de enlace de hidrógeno y π^* es la polarizabilidad [78–80]. Según estos principios para

Introducción

analitos apolares, es decir compuestos que contienen un log P mayores a 2,5, la extracción se verá más favorable al emplear disolventes de la misma polaridad. Para el caso de los compuestos de naturaleza ácida se requieren SLM con altos valores de α y π^* y bajos de β [42,76], como pudiera ser el ejemplo de alcoholes de cadenas larga como 1-octanol, 1-decanol o éteres como DHE [81]. Por el contrario, para analitos básicos, es preferible elegir como SLM solventes de bajos valores de α y altos en β y π^* , como el NPOE [74,78,82].

Por otro lado, cuando se seleccionan analitos polares, con log P menor a 2,5, la selección adecuada de la SLM es más complicada, debido a la dificultad de encontrar un disolvente que sea inmisible con las fases acuosas. Una solución efectiva en ciertos casos para estos sistemas es el empleo de *carriers*, ya que facilita el transporte del analito seleccionado a través de la SLM. Entre los *carriers* más empleados se encuentra Aliquat®336 [83] y el tris-(2-etilhexil) fosfato (TEHP) [84]. Recientemente se han probado para estos analitos disolventes eutécticos, mucho más sostenibles con el medio ambiente, como una nueva alternativa para este tipo de analitos tanto para LPME [85] como EME [86].

Finalmente, diferentes materiales de membranas han sido estudiadas para dar soporte al disolvente orgánico, algunos ejemplos son: polidimetilsiloxano, carboxen/polidimetilsiloxano, polidimetilsiloxano/divinilbenzeno, entre otras. [43] Sin embargo, las membranas de PP han destacado frente al resto de sus competidoras debido a los resultados alcanzados, siendo las más populares las que presentan características de 0,2 μm , 55% de porosidad y un espesor comprendido entre 25-200 μm . [48,70] Un estudio reciente donde se evalúa el efecto del espesor de la membrana plana de PP en la transferencia de masas, concluye que espesores más delgados (25 μm) ofrecen un mejor y más eficiente transporte de los analitos frente a espesores más gruesos. Dejando claro la importancia de trabajar con espesores delgados, además de consumir menos volumen de disolvente. [87] Las investigaciones recientes, donde se desarrollan sistemas de extracción con membranas de gel de agarosa, posibilitan una nueva alternativa para la sustitución a corto plazo las membranas de PP, formando de esta manera, sistemas más ecológicos a los actuales, tan demandantes en el futuro cercano [31].

Introducción

1.2.1.2. Composición de la fase aceptora y donadora

La selección de una adecuada composición de fases depende de la técnica empleada, ya que cuando el mecanismo de acción que rige el sistema es la difusión pasiva (LPME), el analito neutro atraviesa la SLM hacia la fase aceptora, encontrándose el analito ionizado en esta fase. En cambio, para la EME, el analito ionizado en atraviesa la SLM hacia la fase aceptora (donde se encuentra también ionizado) gracias a la electromigración. Teniendo en cuenta estas bases, es deducible pensar la importancia de la optimización del pH de cada una de las fases, que debe ser estudiado en función del pKa del analito o analitos seleccionados.

Para el caso de la LPME, la literatura ha demostrado que mantener pHs extremos y opuestos en cada uno de los canales que contienen las fases, facilita la difusión hacia la fase aceptora. Es decir, en el caso de analitos ácidos, la extracción se ve favorecida al seleccionar pHs fuertemente ácidos en la muestra (donde permanece neutro) y fuertemente básicos en el canal aceptor (donde se encuentra cargado), seleccionando los pHs opuestos para el caso de analitos básicos.

En cambio, si seguimos un sistema por EME es necesario emplear pHs fuertemente básicos, si queremos que los analitos ácidos cargados migren hacia la fase aceptora, donde se encuentra el polo positivo; o pHs fuertemente ácidos en caso de analitos básicos. Algunos trabajos publicados han demostrado que el ajuste de pHs utilizando NaOH o HCL mejora la eficiencia de extracción, ya que consiguen la liberación de una cantidad mayor de analitos en las interfases de la SLM con la fase aceptora acuosa [88,89].

Sin embargo, hay que prestar especial atención en el uso de bases o ácidos fuertes, especialmente en el caso de EME. Una de las consecuencias producidas al aplicar una diferencia de potencial entre las dos fases acuosas es la formación de electrolisis alrededor del electrodo de cada canal. Durante la electrolisis, se generan aniones hidroxilos (cátodo) y/o protones (ánodo) en las fases acuosas. Consecuentemente, al aumentar la concentración de estas especies en cada una

Introducción

de las fases se producen cambios de pHs con respecto al pH inicial de extracción, variando la eficiencia de extracción. Una solución sencilla a estos cambios de pHs es el empleo de disoluciones tamponadas (buffers) para mantener el pH constante durante la extracción. No obstante, la mayoría de los buffers están compuestos por sales solubles en agua que aumentan la conductividad durante el proceso de extracción e incrementa exponencialmente la corriente eléctrica en EME, generando un sistema inestable y menos reproducible. Por tanto, es importante estudiar también el tipo y concentración de buffer empleado con el objetivo de conseguir sistemas estables [90,91].

1.2.1.3. Caudal de la fase aceptora y donadora

En sistemas microfluídicos, el caudal de ambas fases es considerado un parámetro importante a la hora de conseguir eficiencias de extracción altas o buenos factores de preconcentración. Por una parte, si nuestro objetivo es conseguir altos enriquecimientos, la selección del menor caudal posible en la fase aceptora, frente al mayor caudal en la fase donadora (sin crear inestabilidad en el sistema) hace posible alcanzar mayores valores del factor de enriquecimiento [48]. En cambio, trabajar a caudales más lentos en ambas fases, aumenta el tiempo de residencia de los analitos en los canales, mejora el contacto con la SLM y favorece la transferencia de masas.

En microfluídica es necesario que el flujo circule de modo laminar (N° de Reynolds ≥ 2040), de tal manera que el gradiente de velocidad producido por el movimiento de las partículas dentro de un flujo siga una trayectoria definida, avanzando en forma de láminas y manteniendo un sistema estable. Teniendo en cuenta este principio, hay que tener especial control con las presiones dentro del dispositivo ya que, podrían generar una inestabilidad, especialmente al impulsar las disoluciones dentro de los canales, incluso llegar a romper la membrana. Cuando se opera bajo condiciones de flujo estacionario, uno de los principales retos que se plantea es

Introducción

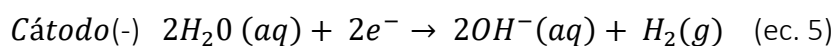
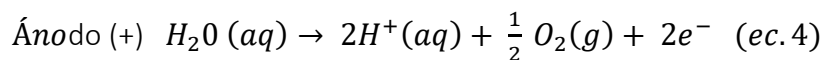
mantener el equilibrio de las presiones de ambos canales con uno de los flujos a caudal cero. Además una diferencia significativa de caudal entre ambos canales conlleva a un sistema inestable bajo régimen de flujo dinámico [61].

1.2.1.4. Voltaje

El voltaje es un parámetro experimental que influye en la EME, ya que la migración de las especies cargadas hacia el polo de carga contraria depende directamente del campo aplicado, que este a su vez depende de la diferencia de potencial (voltaje) aplicado entre los dos electrodos [75,92]. Este hecho viene definido por la ecuación de Nernst-Planck (ec. 3) [93], donde se aprecia una relación directa del transporte de masas con la intensidad del campo, para unos mismos electrodos con un área activa y distancia determinado:

$$J_j(x) = -D_j \frac{\partial C_j(x)}{\partial x} - \frac{z_j F}{RT} D_j C_j \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} \quad (\text{ec. 3})$$

Sin embargo, aunque un mayor voltaje genere un mayor campo eléctrico, a través de la ley de Ohm es fácilmente demostrable que la corriente crece al aumentar el voltaje, y a ciertos niveles de voltaje la corriente se incrementa exponencialmente, dando lugar a la electrolisis, un fenómeno que genera una gran inestabilidad en el sistema (ec. 4 y 5) [94,95]:



Introducción

Como se aprecia en las reacciones, la formación de gases genera burbujas dentro del canal, favoreciendo el aumento exponencial de la corriente y provocando una significativa inestabilidad al sistema [90,96,97].

1.2.1.5 Modos operacionales y automatización

1.2.2.5.1. Modos operacionales

Existen dos métodos operacionales fundamentalmente, condiciones de doble flujo (modo dinámico) y condiciones de *stop-flow* (modo estacionario) [48]. Dependiendo del modo de operación, las eficiencias de extracción y el factor de enriquecimiento son determinantes.

En *set-ups* tradicionales donde se emplean estas técnicas, tanto el flujo de la fase aceptora como el flujo de la fase donadora se encuentra en estado estacionario, este hecho aumenta la relación de volúmenes en las interfases, logrando mejoras en los factores de enriquecimiento, pero bajas eficiencias de extracción. Cuando se integran la LPME y/o EME en dispositivos microfluídicos, la relación de volúmenes que existen entre ambas fases es pequeña, mejorando significativamente la eficiencia de extracción aunque dificultando alcanzar altas preconcentraciones [57,58]. En estos sistemas se puede mejorar el factor de enriquecimiento aumentando el caudal donador frente a la aceptora en condicione de doble flujo [60]; o bien, aumentando el caudal donador con el caudal aceptor parado, empleando diferentes tiempos de extracción (*stop-flow*) [48,62].

De los trabajos publicados se concluye que el modo de operación está directamente relacionado con los caudales de las fases empleadas, especialmente en condiciones de doble flujo. En estos casos, mayores caudales de muestra dan lugar a eficiencias de extracción más bajas, debido a la disminución del tiempo de residencia de la muestra con la SLM [60].

En cambio, para lograr altos enriquecimientos es necesario aumentar el tiempo del área de contacto manteniendo la fase aceptora parada (*stopped-flow*), por lo que el tiempo de

Introducción

extracción y la velocidad del caudal de ambas fases deben optimizarse de manera simultánea [62,63].

1.2.1.5.2. Automatización

Los sistemas microfluídicos se han desarrollado para permitir medidas *off-line* y *on-line* acoplado a instrumentos de análisis. En los trabajos donde se han empleado medidas *off-line*, los analitos que se encuentran en la fase aceptora son recogidos y posteriormente analizados en un instrumento de análisis como cromatografía líquida (HPLC), electroforesis capilar (CE) o espectrometría de masas (MS) [59,65]. Sin embargo, el acoplamiento *on-line* de estos dispositivos a instrumentos de análisis permiten dar un paso más hacia la integración total de un dispositivo completo de tratamiento de muestras. La Fig. 8a y 8b muestra un esquema de estos sistemas de extracción acoplados a un equipo HPLC (a) y a un MS (b). Para realizar estas medidas *on-line* la salida de la fase aceptora es conectada directamente con el equipo de análisis muestras la muestra es inyectada en continuo con una jeringa, logrando una mayor automatización del análisis [1,43].

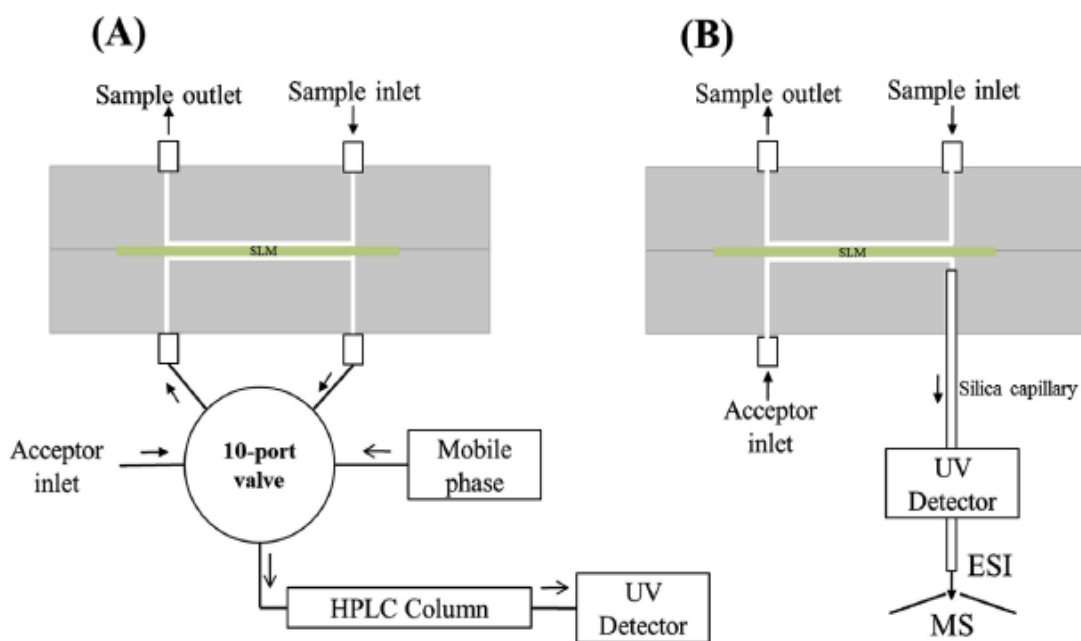


Fig. 8. Esquemas de automatización en dispositivos microfluídicos integrados en LPME a) un equipo de HPLC y b) a un equipo de MS.

Introducción

1.3. Evaluación del rendimiento de extracción

Para determinar la eficacia del proceso de extracción, es necesario determinar la concentración del analito que ha sido extraído desde la muestra hacia la fase aceptora. Para determinar la cantidad del analito hace falta emplear técnicas de análisis para cuantificar la concentración real obtenida a través de una recta de calibrado. En esta tesis el equipo de análisis empleado es la cromatografía líquida de alta resolución.

Para determinar esta eficacia de extracción se emplean dos términos, la eficiencia de extracción (EE), que responde a la cantidad de analito recuperado durante la extracción y (EF), referido a la cantidad de analito preconcentrado en la fase aceptora.

En términos matemáticos podemos definir la EE como el cociente del número de moles de analitos encontrados en la fase aceptora entre el número de moles de los analitos introducidos inicialmente (ec. 1):

$$EE = \frac{n_a}{n_o} \times 100\% = \frac{V_a C_a}{V_o C_o} \quad (ec. 1)$$

Donde n_a es la cantidad de moles encontradas en la fase aceptora, n_o la cantidad de moles iniciales que contiene la muestra, V_a es el volumen utilizado en la fase aceptora, V_o volumen empleado en la fase donadora, C_a la concentración de analitos finales obtenidos y C_o la concentración inicial de los compuestos de interés.

Mientras que el factor de enriquecimiento se define mediante la siguiente fórmula (ec. 2):

$$EF = \frac{C_a}{C_o} = EE \times \frac{V_a}{V_o} \quad (ec. 2)$$

Introducción

1.4. espectroscopía de impedancia (EIS)

La espectroscopía de impedancia (EIS) es una técnica que se comienza a aplicar sobre los años 70, y coincide con el auge de circuitos eléctricos cada vez más rápidos y sensibles, capaces de generar y analizar una señal de frecuencia y fase variable. EIS es una técnica no destructiva, muy sensible a pequeños cambios que ocurren en el sistema, permitiendo la caracterización eléctrica de los materiales y sistemas electroquímicos [98].

La EIS es un método electroquímico donde una señal de corriente alterna (CA) es aplicada a un electrodo para determinar la respuesta generada; es decir, un potencial (E) es aplicado a un electrodo y la corriente generada (I) es determinada a diferentes frecuencias aplicadas. Los valores de impedancia y frecuencia obtenidos generan el espectro de impedancia. En el caso de los estudios de membranas, los espectros de impedancia obtenidos suelen ser analizados mediante circuitos eléctricos. Estos circuitos están formados por componentes como resistencias (R), capacitancias (C), inductancias (L), etc, denominándose “circuitos eléctricos equivalentes” y son necesarios para determinar e interpretar los valores obtenidos en el espectro de impedancia [98].

Un circuito equivalente es una combinación de elementos eléctricos pasivos (como los nombrados anteriormente) que dan una misma respuesta de una celda electroquímica, a un rango de frecuencia determinado. El número de circuitos eléctricos que pueden dar respuesta a un sistema electroquímico son ilimitados (y más en sistema complejo), por lo tanto, es de suma importancia que el circuito propuesto tenga una explicación física. Es decir, aunque dos circuitos equivalentes puedan describir un mismo diagrama de impedancia, solo uno de ellos es más acorde desde una perspectiva física.

Matemáticamente, en circuitos de CA, la impedancia se representa como el cociente de potencial aplicado (E_0) (medido en voltios) y la intensidad medida en la salida del sistema (I_0) (medido en amperio). La ley de Ohm explica la relación entre corriente y potencial de un circuito con corriente directa (CD) [99] (Ec. 6).

Introducción

$$R = \frac{E_0}{I_0} \quad (\text{ec. 6})$$

Si trabajamos bajo condiciones de corriente alterna la medición de la resistencia es representada por la impedancia (Z) y medidas en unidades de ohms, definida por la ec. 7

$$Z = \frac{E_0(\omega)}{I_0(\omega)} \quad (\text{ec. 7})$$

Al trabajar con corriente alterna sometemos al sistema a una perturbación dependiente del tiempo y este proporciona una respuesta que también depende del tiempo, pero sin ser inmediata, esta diferencia de tiempo entre la perturbación y la respuesta generada se le llama desfase (ϕ). Al utilizar corriente alterna, es necesario operar con números imaginarios, y esto nos permiten representar la impedancia en coordenadas imaginarias o polares, necesarias para la representación de los resultados obtenidos de las medidas de impedancias. Existe dos maneras de representar los espectros de impedancia:

- **Diagrama de Nyquist**, donde es representada la parte imaginaria (multiplicada por -1), frente la parte real, es decir $-Z''/Z'$. Este es la representación gráfica que se utilizará en esta tesis.
- **Diagrama de Bode**, donde se grafica el log de impedancia ($\log Z$) y el desfase, frente a la frecuencia (ω).

A partir de la correcta interpretación de los datos de impedancia se pueden determinar distintos procesos electroquímicos que se dan en la celda, en función de la frecuencia empleada como es la resistencia de la solución, la polarización o información sobre la doble capa de

Introducción

Helmholtz, siendo esta última de especial interés en los procesos de transporte de masas. Según la frecuencia aplicada obtenemos diferente tipo de información, a frecuencias altas la información obtenida estará relacionado con la resistencia a la solución, mientras que a frecuencias bajas está ligada a procesos cinéticos [99].

1.4.1. Elementos impedimétricos

Desde un punto de vista químico-físico, podemos definir un electrodo como la interfase entre la solución del medio y un elemento conductor. Cuando una corriente es aplicada a un electrodo se generan dos fenómenos, por un lado, al ser un material conductor tiene una componente resistiva al movimiento de los electrones a través de él y por otra parte, este movimiento genera una polarización en el propio electrodo generando una componente capacitiva. Esta polarización induce en la interfase electrodo-disolución una capa de difusión que depende del tiempo, conocida como doble capa de Helmholtz. La doble capa (en una interfase metal-disolución) consiste, en un exceso o defecto de electrones en el metal y una cantidad equivalente de iones de carga opuesta a una distancia d que depende del radio iónico. Este fenómeno es equivalente a un condensador (Cdl) en un circuito eléctrico [100].

De un modo general, la impedancia de una interfase puede ser representada mediante números complejos:

$$Z(\omega) = Z_{Re} - i Z_{Im} \quad (ec.8)$$

Introducción

Donde Z_{Re} representan las partes reales de la impedancia y Z_{Im} la parte imaginaria. El caso más sencillo que nos podemos encontrar es el formado por un circuito formado por una resistencia y un condensador en serie:

$$Z_{Re} = R \quad (ec. 9)$$

$$Z_{Im} = \frac{1}{j\omega C} \quad (ec. 10)$$

El ángulo de fase viene a ser una expresión de la relación existente entre las componentes capacitiva y resistiva de la impedancia en el circuito en serie. Puede ser que el circuito tenga un comportamiento donde solo existe una única resistencia, $\phi = 0$ o, por el contrario, que solo exista un condensador, $\phi = \pi/2$. De esta manera, cuando tenemos un sistema compuesto por varias resistencias y condensadores, tenemos valores de fase comprendidos entre 0 y $\pi/2$.

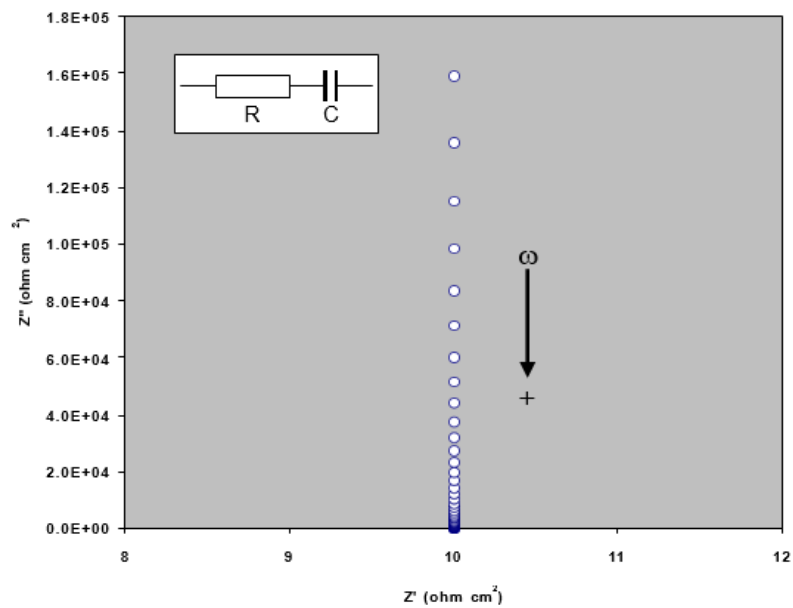


Fig. 9. Diagrama de Nyquist equivalente a una resistencia en serie con un condensador

Introducción

En este caso (Fig. 9), el diagrama representa una serie de puntos de impedancia a un rango de frecuencias, donde la componente imaginaria (Z') es la componente capacitiva que disminuye a medida que aumenta la frecuencia, quedando constante la componente resistiva. Este tipo de diagramas representa a un sistema donde solo existe un componente resistivo puro. La impedancia global viene dada por la suma de las impedancias, mientras que, en el caso de circuitos en paralelo, la impedancia global es igual a la suma de la inversa impedancias. Esta impedancia (Ec. 11) en paralelo viene representada por un circuito formado por una resistencia y un condensador en paralelo:

$$\frac{1}{Z(\omega)} = \frac{1}{R} - \frac{\omega C}{j} \quad (\text{ec. 11})$$

Un caso más acorde a situaciones reales es lo representado en la Fig. 10. En este diagrama se representa la respuesta a una interfase electroquímica. El circuito equivalente correspondiente a estos tipos de gráficos está compuesto por una resistencia a la transferencia de carga (R) en paralelo con una Cdl, que a su vez están en serie con una resistencia a la solución. Cuando se dan estos circuitos, la tendencia del circuito a comportarse como un condensador será mayor cuanto más elevada sea la frecuencia.

Introducción

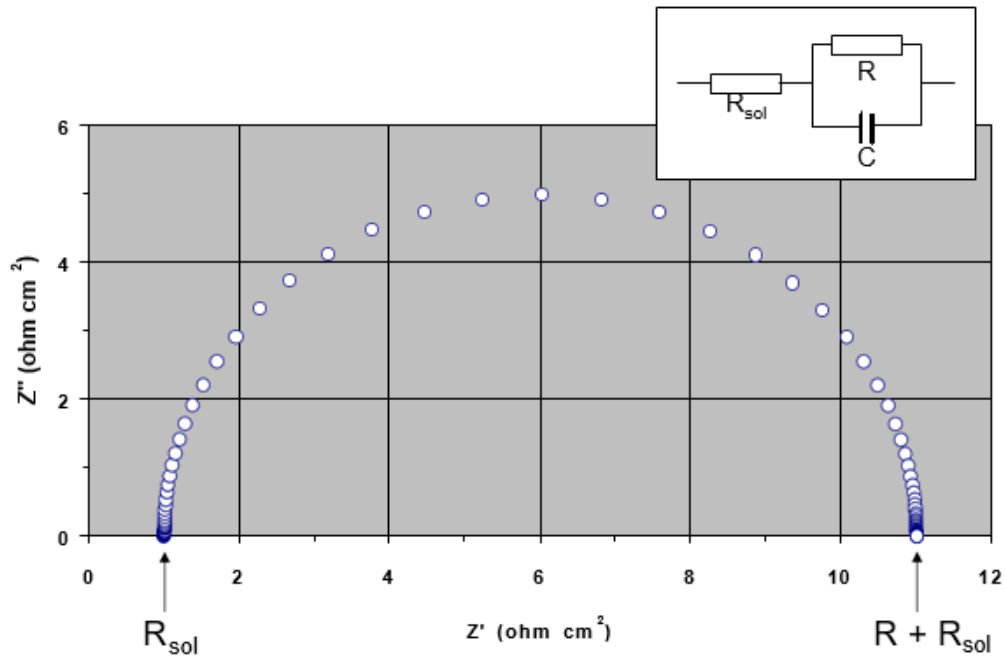


Fig. 10. Diagrama de Nyquist equivalente a un en paralelo de una resistencia a la transferencia de carga con un condensador y en serie a la resistencia a la solución

El circuito equivalente más popular y que equivale a una reacción electroquímica simple es el conocido como “*circuito de Randles*”[\[101\]](#). En este circuito se incorpora un nuevo elemento (la impedancia de Warburg) en serie con la resistencia a la transferencia de carga. Este elemento viene a representar una especie de resistencia al transporte difusivo. En el ejemplo expuesto en la fig. 11, se aprecia claramente la parte controlada por la parte difusional (línea a unos 45° con el semicírculo) y la parte controlada por la transferencia de carga, correspondiente a la parte del semicírculo a altas frecuencias.

Introducción

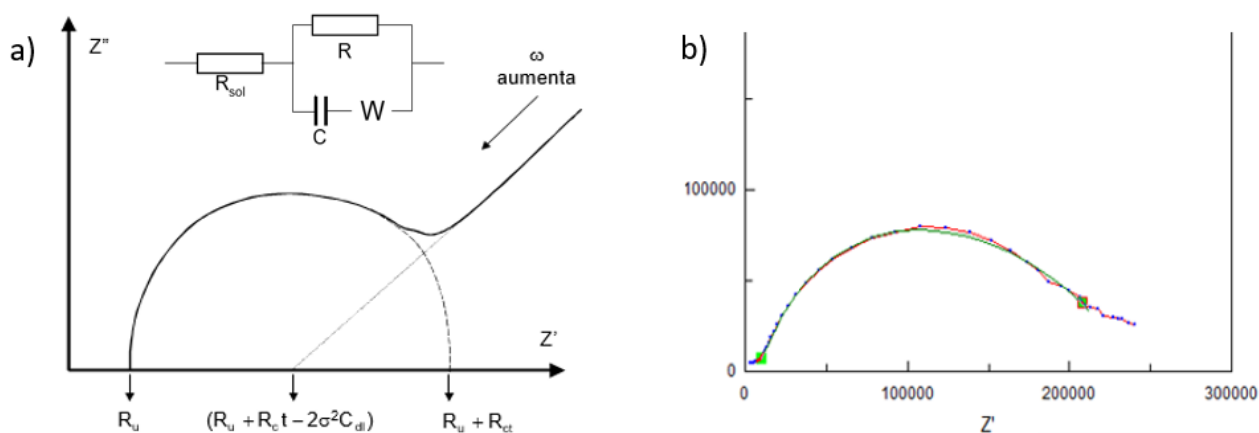


Fig. 11. a) Diagrama de Nyquist equivalente a un circuito de Randles b) Ejemplo espectro de impedancia de un sistema complejo

En sistemas electroquímicos reales, el semicírculo asociado a la capacidad en el espectro de impedancia (Fig 11b)) frecuentemente es más achatado que en los sistemas ideales (Fig. 11 a)). Este fenómeno es asociado a la rugosidad y/o porosidad superficial del electrodo y se identifica como CPE (elemento de fase constante), facilitando el ajuste del circuito equivalente en estos sistemas complejos [102].

1.4.2. Aplicaciones de medidas de EIS en sistema de electromicroextracción (EME) con membranas planas

Un de los motivos principales para aplicar la técnica de EIS en sistemas de extracción por EME es el gran potencial que esta técnica puede otorgar en la caracterización y comprensión detallada de los distintos procesos que se llevan a cabo en las interfases de estos sistemas. Sin embargo, a pesar de que la EIS puede aportar una gran información, no existe demasiada evidencia en la literatura, ya que la correcta interpretación de los datos de impedancia presenta una gran complejidad.

Introducción

En 2016 [103], Mohamadi *et al.* Realiza por primera vez un estudio sobre el comportamiento de la SLM en un sistema EME de fibra hueca, monitorizando las medidas de impedancia bajo condiciones de voltajes a pulso. En este estudio se controla la respuesta de la doble capa, la resistencia a la solución y de la membrana, aplicando el clásico “*circuito de Randles*” para realizar el ajuste de las medidas de impedancia. Las conclusiones obtenidas de este trabajo indican que la capacidad de la doble capa (bajo condiciones óptimas de extracción) aumenta en los primeros 5 minutos de la extracción, decayendo hasta valores que permanecen estables pasado estos 5 minutos. Tras esta publicación, queda desmentida la hipótesis acerca de la progresiva disminución de la capacidad de la membrana a lo largo del tiempo.

Un año más tarde, el grupo de investigación dirigido por Pedersen-Bjergaard, estudia el efecto del buffer en la estabilidad del pH, realizando medidas de impedancia para obtener más información del comportamiento de la doble capa en estos sistemas. De este modo, es posible monitorizar las variaciones del cambio de pH en EME, parámetro que tiene un rol importante en el control de la electrolisis. En esta ocasión, el circuito equivalente propuesto es el presentado en la Fig. 12, donde se divide el dispositivo empleado (96-well plates) en tres partes, correspondientes a la fase donadora, la SLM y fase aceptora [104].

Introducción

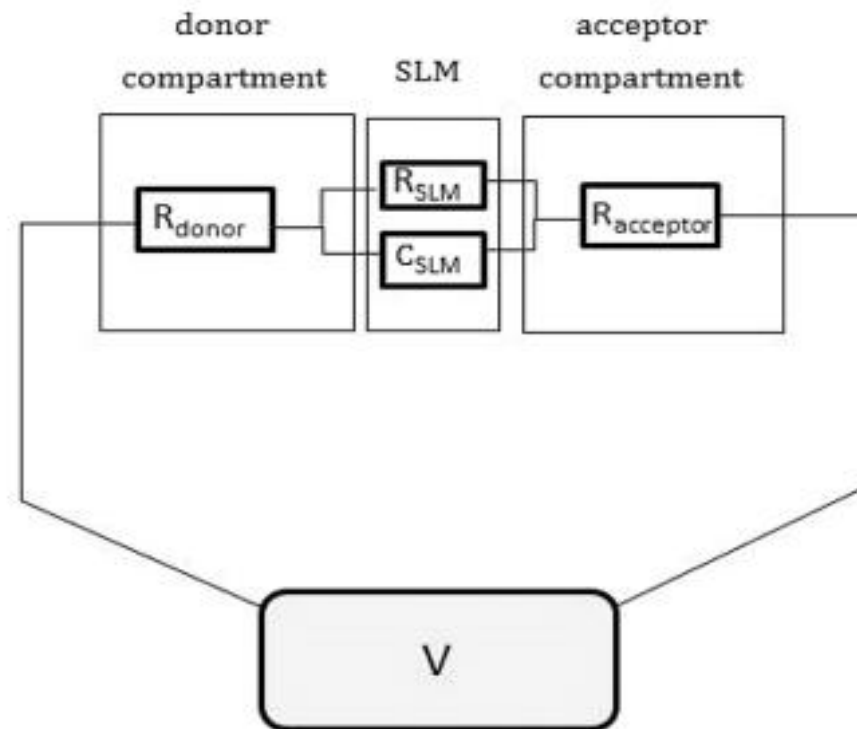


Fig. 12 Esquema del circuito equivalente de un dispositivo 96-well plates.

En 2018 Nasrollahi *et al.* [105] aplican de nuevo la EIS a un sistema de extracción por EME en fibra hueca. Este trabajo desarrolla dos modelos impedimétricos para estudiar el efecto de diferentes sales sobre la resistencia de la solución, la SLM y la capacidad, aplicándolo indistintamente sobre un analito ácido (Naproxeno) y otro básico (Verapramil). Tras el análisis de los resultados, estos investigadores llegan a la conclusión que el tamaño del ión tiene un efecto significativo en la doble capa y en el tiempo de transferencia de carga. Para analitos ácidos, las sales aniónicas disminuyen la resistencia a la solución y aumenta el efecto de la doble capa, disminuyendo el rendimiento de esta. Sin embargo, se obtuvo el efecto contrario al utilizar sales catiónicas. Para analitos básicos, los resultados obtenidos no demostraron ninguna conclusión clara, solo se pudo observar alguna mejora en la extracción al seleccionar sales con contraiones pequeños, efecto también percibido en la extracción de analitos ácidos.

Introducción

1.5. Referencias

- [1] J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M.Á. Bello-López, M. Ramos-Payán, New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Anal. Chim. Acta.* 905 (2016) 8–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.041>.
- [2] 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.011>.
- [3] F. Augusto, E. Carasek, R.G.C. Silva, S.R. Rivellino, A.D. Batista, E. Martendal, New sorbents for extraction and microextraction techniques, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2533–2542. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.033>.
- [4] 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.052>.
- [5] M. de la Guardia, S. Garrigues, Chapter 1 Past{,} Present and Future of Green Analytical Chemistry, in: *Challenges Green Anal. Chem.*, The Royal Society of Chemistry, 2020: pp. 1–18. <https://doi.org/10.1039/9781788016148-00001>.
- [6] H. Kataoka, Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 339–364. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3076-2>.
- [7] Y. Lu, L. Quan, G. Luo, D. Youyuan, Directly Suspended Droplet Microextraction, *Anal. Chim. Acta - ANAL CHIM ACTA.* 566 (2006) 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.02.072>.
- [8] E. Carasek, J. Merib, G. Mafra, D. Spudeit, A recent overview of the application of liquid-phase microextraction to the determination of organic micro-pollutants, *TrAC Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 203–209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.002>.
- [9] M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esrafil, Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications, *Microchim. Acta.* 177 (2012) 271–294. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0773-x>.
- [10] D. Han, K.H. Row, Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples, *Microchim. Acta.* 176 (2012) 1–22. <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0678-0>.
- [11] H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop., *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817–1821. <https://doi.org/10.1021/ac960145h>.
- [12] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop., *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240. <https://doi.org/10.1021/ac960042z>.
- [13] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Miniaturized Preconcentration Methods Based on Liquid-Liquid Extraction and their Application in Inorganic Ultratrace Analysis and Speciation: A Review, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 64 (2009) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.10.042>.
- [14] 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. <https://doi.org/10.1021/ac990055n>.

Introducción

- [15] 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. <https://doi.org/10.1021/ac00126a030>.
- [16] 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. <https://doi.org/10.1021/ac950929f>.
- [17] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques., *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 817 (2005) 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.034>.
- [18] 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. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00634-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00634-4).
- [19] S. Shariati, Y. Yamini, A. Esrafil, Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC-UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics., *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.042>.
- [20] A. Bahrami, F. Ghamari, Y. Yamini, F. Ghorbani Shahna, A. Koolivand, Ion-pair-based hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of urinary benzene, toluene, and styrene metabolites., *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 501–508. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700685>.
- [21] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids, in: *J. Chromatogr. A*, Elsevier, 2006: pp. 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.025>.
- [22] A. Gjelstad, T.M. 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.007>.
- [23] J.-X. Wang, D.-Q. Jiang, Z.-Y. Gu, X.-P. Yan, Multiwalled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction of polybrominated diphenyl ethers in water and milk samples before gas chromatography with electron-capture detection, *J. Chromatogr. A.* 1137 (2006) 8–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.003>.
- [24] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, S.T. Foss, D. Snakenborg, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electro membrane extraction, *Microfluid. Nanofluidics.* 9 (2010) 881–888. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0603-6>.
- [25] Y. Zhang, S. Ge, J. Yu, Chemical and biochemical analysis on lab-on-a-chip devices fabricated using three-dimensional printing, *TrAC Trends Anal. Chem.* 85 (2016) 166–180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.09.008>.
- [26] A. Gjelstad, K. Rasmussen, M. Parmer, S. Pedersen-Bjergaard, Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction: Micro-scale Liquid-liquid-liquid Extraction in the 96-well Format, *Bioanalysis.* 5 (2013) 1377–1385. <https://doi.org/10.4155/bio.13.59>.
- [27] M. Roldán-Pijuán, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma., *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2811–2819. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8505-9>.

Introducción

- [28] K.N. Olsen, K.S. Ask, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction of psychoactive analytes: a novel approach in therapeutic drug monitoring., *Bioanalysis*. 10 (2018) 385–395. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0250>.
- [29] K.S. Ask, T. Bardakci, M.P. Parmer, T.G. Halvorsen, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel artificial liquid membrane extraction as an efficient tool for removal of phospholipids from human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.011>.
- [30] M. Alidoust, M. Baharfar, M. Manouchehri, Y. Yamini, M. Tajik, S. Seidi, Emergence of microfluidic devices in sample extraction; an overview of diverse methodologies, principals, and recent advancements, *TrAC Trends Anal. Chem.* 143 (2021) 116352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116352>.
- [31] H. Tabani, M. Alexovič, J. Sabo, M. Ramos Payán, An overview on the recent applications of agarose as a green biopolymer in micro-extraction-based sample preparation techniques, *Talanta*. 224 (2021) 121892. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121892>.
- [32] E. Carasek, J. Merib, G. Mafra, D. Spudeit, A recent overview of the application of liquid-phase microextraction to the determination of organic micro-pollutants, *TrAC Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 203–209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.002>.
- [33] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction, *J. Chromatogr. A*. 1184 (2008) 132–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.088>.
- [34] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: A critical review, *Anal. Chim. Acta.* 669 (2010) 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.050>.
- [35] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction, *J. Chromatogr. A*. 1184 (2008) 132–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.088>.
- [36] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: A critical review, *Anal. Chim. Acta.* 669 (2010) 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.050>.
- [37] C. Huang, Z. Chen, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, X. Shen, Electromembrane extraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 95 (2017) 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.027>.
- [38] I.J.Ø. 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.006>.
- [39] 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. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700502>.
- [40] 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.096>.
- [41] N.C. Domínguez, A. Gjelstad, A.M. Nadal, H. Jensen, N.J. Petersen, S.H. Hansen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Selective electromembrane extraction at low voltages based on analyte polarity and charge, *J. Chromatogr. A*. 1248 (2012) 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.092>.

Introducción

- [42] H.B. Dugstad, N.J. Petersen, H. Jensen, C. Gabel-Jensen, S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, Development and characterization of a small electromembrane extraction probe coupled with mass spectrometry for real-time and online monitoring of in vitro drug metabolism., *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 421–429. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7378-z>.
- [43] E. Carasek, J. Merib, Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review., *Anal. Chim. Acta.* 880 (2015) 8–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.049>.
- [44] A. Gjelstad, H. Jensen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Kinetic aspects of hollow fiber liquid-phase microextraction and electromembrane extraction., *Anal. Chim. Acta.* 742 (2012) 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.039>.
- [45] K. Sato, M. Tokeshi, T. Sawada, T. Kitamori, Molecular Transport between Two Phases in a Microchannel., *Anal. Sci.* 16 (2000) 455–456. <https://doi.org/10.2116/analsci.16.455>.
- [46] P. Cui, S. Wang, Application of microfluidic chip technology in pharmaceutical analysis: A review, *J. Pharm. Anal.* 9 (2019) 238–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpha.2018.12.001>.
- [47] M. Sonker, V. Sahore, A.T. Woolley, Recent advances in microfluidic sample preparation and separation techniques for molecular biomarker analysis: A critical review, *Anal. Chim. Acta.* 986 (2017) 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.043>.
- [48] M.R. Payán, E.S. Murillo, J. Coello, M.Á.B. López, A comprehensive study of a new versatile microchip device based liquid phase microextraction for stopped-flow and double-flow conditions, *J. Chromatogr. A.* 1556 (2018) 29–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.051>.
- [49] Y. Abdossalami Asl, Y. Yamini, S. Seidi, B. Ebrahimpour, A new effective on chip electromembrane extraction coupled with high performance liquid chromatography for enhancement of extraction efficiency, *Anal. Chim. Acta.* 898 (2015) 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.052>.
- [50] A. Shahvar, D. Shamsaei, M. Saraji, N. Arab, S. Alijani, Microfluidic-based liquid-liquid microextraction in combination with smartphone-based on-chip detection for the determination of copper in biological, environmental, and food samples, *Microchem. J.* 160 (2021) 105655. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105655>.
- [51] J.Å. Jönsson, L. Mathiasson, Supported liquid membrane techniques for sample preparation and enrichment in environmental and biological analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 11 (1992) 106–114. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-9936\(92\)85008-S](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0165-9936(92)85008-S).
- [52] K. Sato, M. Tokeshi, T. Sawada, T. Kitamori, Molecular Transport between Two Phases in a Microchannel., *Anal. Sci.* 16 (2000) 455–456. <https://doi.org/10.2116/analsci.16.455>.
- [53] S. Dowlatshah, M. Saraji, S. Pedersen-Bjergaard, M. Ramos-Payán, Microfluidic liquid-phase microextraction based on natural deep eutectic solvents immobilized in agarose membranes, *J. Chromatogr. A.* 1657 (2021) 462580. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462580>.
- [54] E. Santigosa, S. Maspoch, M. Ramos Payán, Liquid phase microextraction integrated into a microchip device for the extraction of fluoroquinolones from urine samples, *Microchem. J.* 145 (2019) 280–286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.051>.
- [55] M. Kamankesh, A. Mollahosseini, A. Mohammadi, S. Seidi, Haas in grilled meat: Determination using an advanced lab-on-a-chip flat electromembrane extraction coupled with on-line HPLC, *Food Chem.* 311 (2020) 125876. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125876>.

Introducción

- [56] M. Alidoust, Y. Yamini, M. Baharfar, S. Seidi, F. Rasouli, Microfluidic-enabled versatile hyphenation of electromembrane extraction and thin film solid phase microextraction, *Talanta*. 224 (2021) 121864. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121864>.
- [57] X. Wang, C. Saridara, S. Mitra, Microfluidic supported liquid membrane extraction, *Anal. Chim. Acta*. 543 (2005) 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.04.033>.
- [58] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, S.T. Foss, D. Snakenborg, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electro membrane extraction, *Microfluid. Nanofluidics*. 9 (2010) 881–888. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0603-6>.
- [59] M.D. 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. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.023>.
- [60] M. Ramos-Payan, S. Maspoch, A. Llobera, An effective microfluidic based liquid-phase microextraction device (μ LPME) for extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological and environmental samples, *Anal. Chim. Acta*. 946 (2016) 56–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.09.040>.
- [61] M. Ramos-Payan, S. Maspoch, A. Llobera, A simple and fast Double-Flow microfluidic device based liquid-phase microextraction (DF- μ LPME) for the determination of parabens in water samples, *Talanta*. 165 (2017) 496–501. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.059>.
- [62] Y.A. Asl, Y. Yamini, S. Seidi, A novel approach to the consecutive extraction of drugs with different properties via on chip electromembrane extraction, *Analyst*. 141 (2016) 311–318. <https://doi.org/10.1039/C5AN02019K>.
- [63] M. Baharfar, Y. Yamini, S. Seidi, M. Karami, Quantitative analysis of clonidine and ephedrine by a microfluidic system: On-chip electromembrane extraction followed by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*. 1068–1069 (2017) 313–321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.062>.
- [64] M. Karami, Y. Yamini, Y. Abdossalami Asl, M. Rezazadeh, On-chip pulsed electromembrane extraction as a new concept for analysis of biological fluids in a small device, *J. Chromatogr. A*. 1527 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.049>.
- [65] B. Li, N.J. Petersen, M.D.R. Payán, S.H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, Design and implementation of an automated liquid-phase microextraction-chip system coupled on-line with high performance liquid chromatography, *Talanta*. 120 (2014) 224–229. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.016>.
- [66] F. Zarghampour, Y. Yamini, M. Baharfar, M. Faraji, Simultaneous extraction of acidic and basic drugs via on-chip electromembrane extraction using a single-compartment microfluidic device, *Analyst*. 144 (2019) 1159–1166. <https://doi.org/10.1039/C8AN01668B>.
- [67] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, X. Shen, S. Pedersen-Bjergaard, Combination of Electromembrane Extraction and Liquid-Phase Microextraction in a Single Step: Simultaneous Group Separation of Acidic and Basic Drugs, *Anal. Chem*. 87 (2015) 6951–6957. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01610>.
- [68] H. Tabani, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, Simultaneous determination of acidic and basic drugs using dual hollow fibre electromembrane extraction combined with CE, *Electrophoresis*. 34 (2013) 269–276. <https://doi.org/10.1002/elps.201200330>.

Introducción

- [69] 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. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.007>.
- [70] 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.048>.
- [71] M. Ramos Payán, E. Santigosa, R. Fernández Torres, M.Á. Bello López, A New Microchip Design. A Versatile Combination of Electromembrane Extraction and Liquid-Phase Microextraction in a Single Chip Device, *Anal. Chem.* 90 (2018) 10417–10424. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02292>.
- [72] E. Santigosa-Murillo, S. Maspoch, M. Muñoz, M. Ramos-Payán, An efficient microfluidic device based on electromembrane extraction for the simultaneous extraction of acidic and basic drugs, *Anal. Chim. Acta.* 1160 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338448>.
- [73] M. Ramos-Payán, Liquid - Phase microextraction and electromembrane extraction in millifluidic devices:A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 1080 (2019) 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.075>.
- [74] 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. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.038>.
- [75] H.R. Moazami, S. Nojavan, P. Zahedi, S.S.H. Davarani, Electronic simulation of the supported liquid membrane in electromembrane extraction systems: Improvement of the extraction by precise periodical reversing of the field polarity., *Anal. Chim. Acta.* 841 (2014) 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.048>.
- [76] C. Huang, A. Gjelstad, S. Pedersen-bjergaard, Organic solvents in electromembrane extraction : recent insights, 35 (2016) 169–183. <https://doi.org/10.1515/revac-2016-0008>.
- [77] 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.039>.
- [78] K.F. Seip, M. Faizi, C. Vergel, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Stability and efficiency of supported liquid membranes in electromembrane extraction—a link to solvent properties., *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2151–2161. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7418-8>.
- [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. <https://doi.org/10.1021/ja00426a036>.
- [80] M.J. Kamlet, J.L.M. Abboud, M.H. Abraham, R.W. Taft, Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, .pi.*, .alpha., and .beta., and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 2877–2887. <https://doi.org/10.1021/jo00165a018>.
- [81] N. Drouin, P. Kubáň, S. Rudaz, S. Pedersen-Bjergaard, J. Schappler, Electromembrane extraction: Overview of the last decade, *TrAC Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 357–363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.024>.
- [82] N. Drouin, P. Kubáň, S. Rudaz, S. Pedersen-Bjergaard, J. Schappler, Electromembrane extraction: Overview of the last decade, *TrAC Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 357–363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.024>.

Introducción

- [83] C. Román-Hidalgo, M.J. Martín-Valero, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, M.Á. Bello-López, New nanostructured support for carrier-mediated electromembrane extraction of high polar compounds., *Talanta*. 162 (2017) 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.022>.
- [84] C. Huang, H. Jensen, K. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Mass transfer in electromembrane extraction - The link between theory and experiments, *J. Sep. Sci.* 39 (2015). <https://doi.org/10.1002/jssc.201500905>.
- [85] E. Santigosa, S. Pedersen-Bjergaard, M. Muñoz, M. Ramos-Payán, Green microfluidic liquid-phase microextraction of polar and non-polar acids from urine, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 3717–3723. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03320-9>.
- [86] F.A. Hansen, E. Santigosa-Murillo, M. Ramos-Payán, M. Muñoz, E. Leere Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction using deep eutectic solvents as the liquid membrane, *Anal. Chim. Acta.* 1143 (2021) 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.044>.
- [87] L. Ryšavá, M. Dvořák, P. Kubáň, The effect of membrane thickness on supported liquid membrane extractions in-line coupled to capillary electrophoresis for analyses of complex samples., *J. Chromatogr. A.* 1596 (2019) 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.067>.
- [88] A.M.A. Alsharif, G.-H. Tan, Y.-M. Choo, A. Lawal, Efficiency of Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Chromatography Methods in the Separation of Organic Compounds: A Review, *J. Chromatogr. Sci.* 55 (2016) 378–391. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw188>.
- [89] S. Pedersen-Bjergaard, C. Huang, A. Gjelstad, Electromembrane extraction—Recent trends and where to go, *J. Pharm. Anal.* 7 (2017) 141–147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.04.002>.
- [90] A. Šlampová, P. Kubáň, P. Boček, Additional considerations on electrolysis in electromembrane extraction., *J. Chromatogr. A.* 1429 (2016) 364–368. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.028>.
- [91] P. Kubáň, P. Boček, The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extraction: The role of acceptor solution, *J. Chromatogr. A.* 1398 (2015) 11–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.024>.
- [92] S. Seidi, Y. Yamini, A. Heydari, M. Moradi, A. Esrafil, M. Rezazadeh, Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis., *Anal. Chim. Acta.* 701 (2011) 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.042>.
- [93] 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.057>.
- [94] T. Rahmani, A. Rahimi, S. Nojavan, Study on electrical current variations in electromembrane extraction process: Relation between extraction recovery and magnitude of electrical current., *Anal. Chim. Acta.* 903 (2016) 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.024>.
- [95] L. Fotouhi, S. Seidi, Y. Yamini, E. Hosseini, Evaluation of pulsed electromembrane extraction for the analysis of diclofenac and mefenamic acid in biological fluids, *Anal. Methods.* 7 (2015) 2848–2854. <https://doi.org/10.1039/C4AY02422B>.
- [96] 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. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.019>.

Introducción

- [97] H. Kataoka, K. Saito, Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 926–950. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.010>.
- [98] J.R. Macdonald, W.B. Johnson, I.D. Raistrick, D.R. Franceschetti, N. Wagner, M. Mckubre, D. Macdonald, B. Sayers, N. Bonanos, B.C.H. Steele, E.P. Butler, W.L. Worell, M. Strømme, S. Malmgren, S. Sundaram, G.R. Engelhardt, Y. Barsukov, W.G. Pell, C.M. Roland, R. Eisenberg, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, Third Edition, 2018.
- [99] A.J. Bard, *Electrochemical methods : fundamentals and applications* / Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, *Electrochem. Methods Fundam. Appl.* (2001).
- [100] S. Grimnes, Ø.G. Martinsen, Chapter 7 - Electrodes, in: S. Grimnes, Ø.G. Martinsen (Eds.), *Bioimpedance Bioelectr. Basics* (Third Ed., Third Edit, Academic Press, Oxford, 2015: pp. 179–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411470-8.00007-6>.
- [101] J.E.B. Randles, Kinetics of rapid electrode reactions, *Discuss. Faraday Soc.* 1 (1947) 11–19. <https://doi.org/10.1039/DF9470100011>.
- [102] U. Piratoba, E. Vera, C. Ortiz, Basic aspects in the interpretation of the diagrams of electrochemical impedance, *DYNA.* 77 (2010) 13–19.
- [103] 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.002>.
- [104] M.S. Restan, H. Jensen, X. Shen, C. Huang, Ø.G. Martinsen, P. Kubáň, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Comprehensive study of buffer systems and local pH effects in electromembrane extraction, *Anal. Chim. Acta.* 984 (2017) 116–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.049>.
- [105] S.S. Nasrollahi, S.S.H. Davarani, H.R. Moazami, Impedometric investigation of salt effects on electromembrane extraction: Practical hints for pH adjustment, *Electrochim. Acta.* 296 (2019) 355–363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.11.037>.

Results and discussion

2. Results and discussion

Results and discussion

2.1. Impedance model for voltage optimization of parabens extraction in an electromembrane microfluidic device.

In this work, an EIS characterization of a simple microfluidic device using the electromembrane (EME) was proposed. The EME consists of the transport of the selected analytes from the sample phase (which contains the analytes) to the acceptor phase, where they are collected and analysed. Through the exhaustive study of the electrochemical parameters inside the system and a correct adjustment of the equivalent circuit of this specific device, it was possible to significantly reduce and simplify the optimization time of the experimental parameters.

The device proposed in this work (Fig. 13) consisted of two PMMA plates, where two microfluidic channels of dimensions 23 x 3 x 0.140mm (length x width x depth) were used. The acceptor and donor phase solutions were connected with a Nemesys micro-syringe pump. Plates were parallel to each other and separated by a PP membrane of 55% porosity, with a thickness of 25 μ m and a pore size of 0.21 μ m x 0.05 μ m. A cylindrical platinum was located along each microchannels wire where the potential was applied. Finally, 6 μ L of 1-octanol was used as organic solvent as supported liquid membrane (SLM).

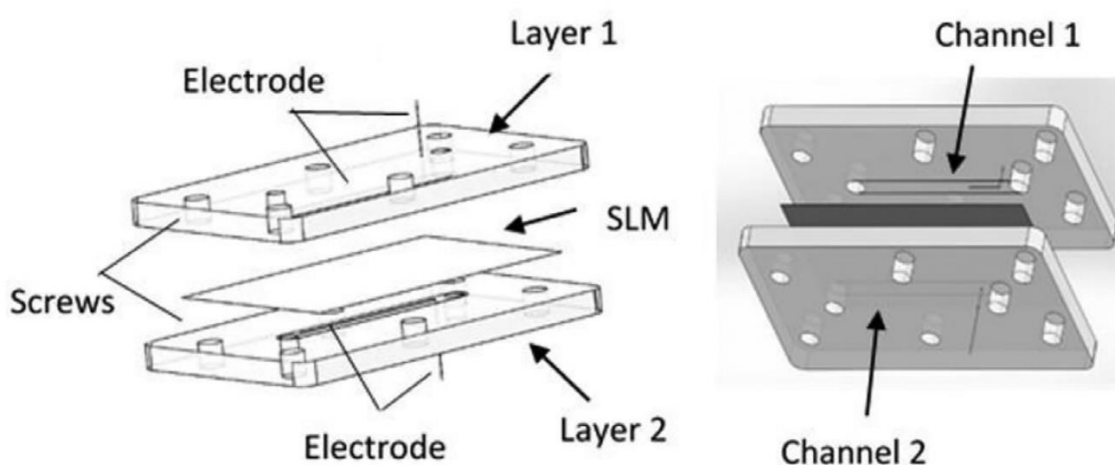


Fig. 13. Scheme of the μ EME device

Results and discussion

Impedance measurements were performed in order to understand the nature and electrical behaviour of this device. Due to the complexity of this extraction system and the sensitivity of the EIS measurements, the characterisation of the system was performed under three experimental conditions. Those conditions were: the device without the flat PP membrane (Fig. 14 (i)), the device with the flat PP membrane but without the organic solvent (Fig. 14 (ii)), and finally, a more complex system with all components (Fig. 14 (iii)). Once identified and validated by comparison with theoretical physical values, the electrical parameters associated with the SLM were used to elaborate an impedimetric model.

Electrically, this EME device consists of 3 capacitive components with 3 resistances in parallel, each of these circuits connected in series. As shown in the fig. 14 (iii), each of the parallel circuit corresponds to the acceptor phase, the SLM (membrane + Octanol) and the donor phase. From the results obtained, it was concluded that the weight of the electrical circuit associated with membrane is the most important and corroborated the fundamental role of the supported liquid membrane in the extraction.

Thanks to the knowledge of the characteristics and electrical magnitudes of the membrane resistances, the transport of 3 ionised parabens (Ethyl 4-hydroxybenzoate, Butyl 4-hydroxybenzoate, IsoButyl 4-hydroxybenzoate) towards the positive pole were monitored on real time. After analysing these results, it was determined that the best extraction voltages were between 4 and 6V.

Results and discussion

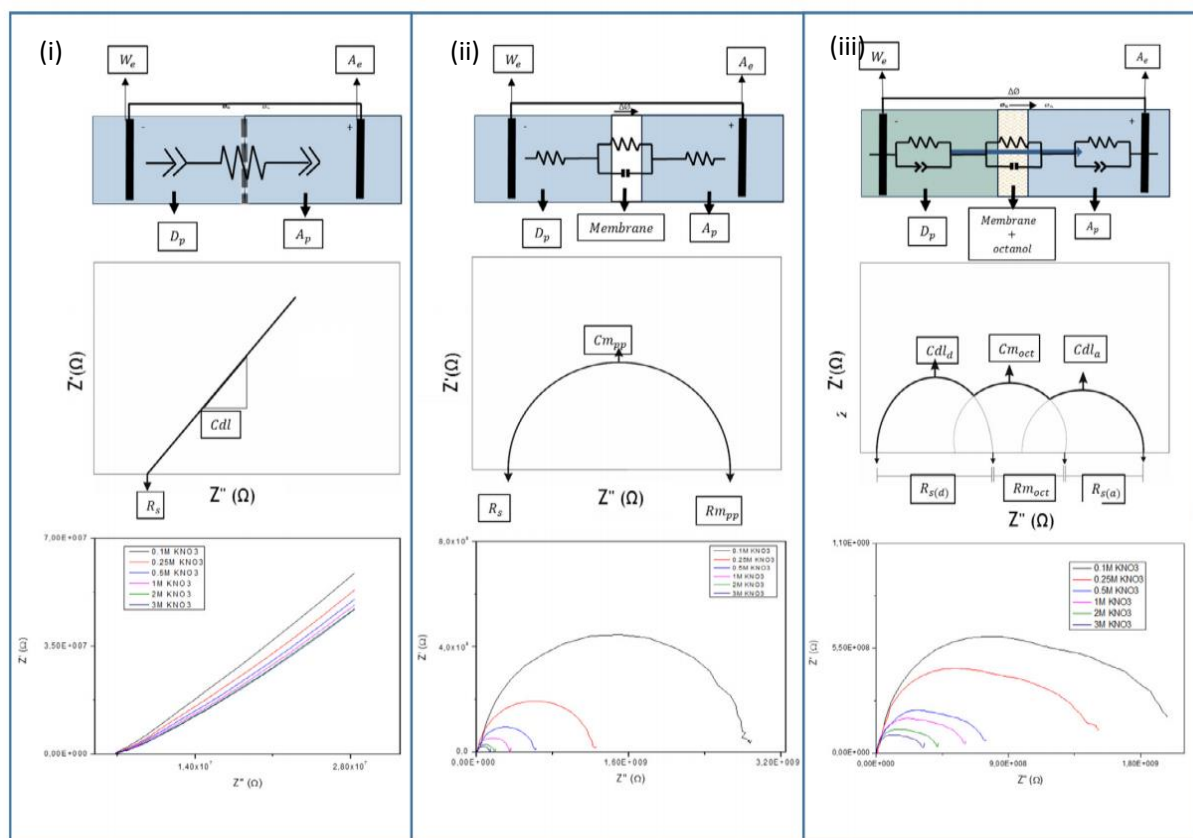


Fig. 14. Electrical parameters scheme of μ EME device (i) The device without μ EME, (ii) the device with μ EME, (iii) the device μ EME device with octanol

In addition, the voltage optimisation between 1-40 V was studied under double flow conditions to compare the conclusions obtained from the impedance analysis, Fig. 15 shows the efficiencies obtained when using different voltages. As seen, efficiencies near 100% were found when 4V was used, with standard deviations below 6%. On the other hand, the current intensities obtained at this value were around 5 μ A, which provided a very stable system over time. After studying the membrane lifetime at low currents, consecutive extractions were carried out. This result showed that it was possible to perform continuous extractions up to 5h with RSD less than 7% when using 5V and 1-octanol as SLM. These surprising results allowed the stability of the extraction systems to be considerably increased. Data from the literature showed that up to now,

Results and discussion

it was not possible to work for more than one hour of extraction, thus the extraction stability performance has been enhanced by 5 times.

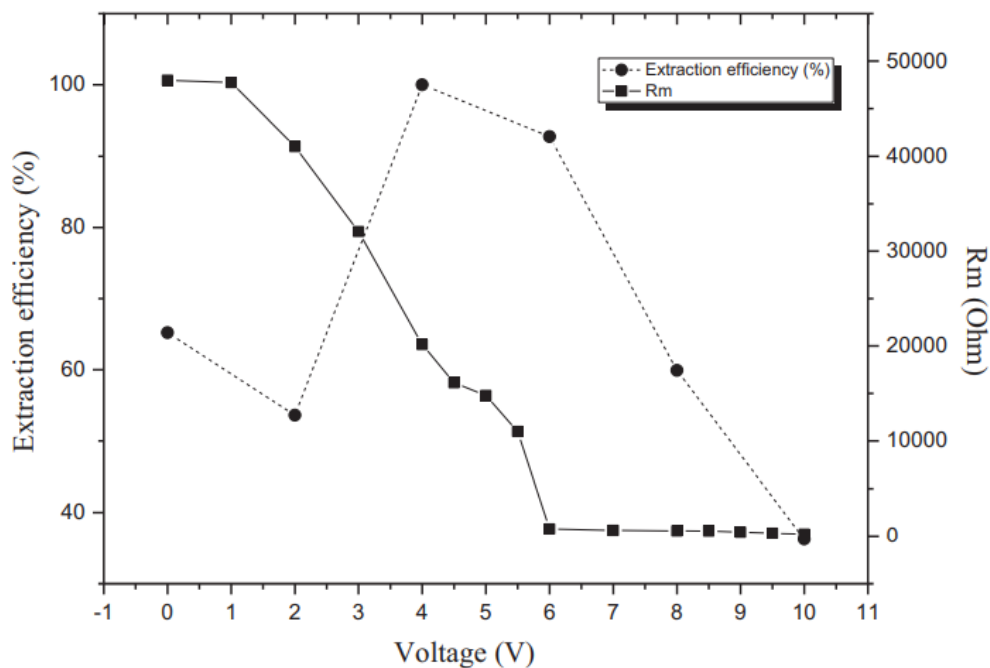


Fig. 15. Relation between extraction efficiency (%) and $R_{m_{oct}}$ vs voltage

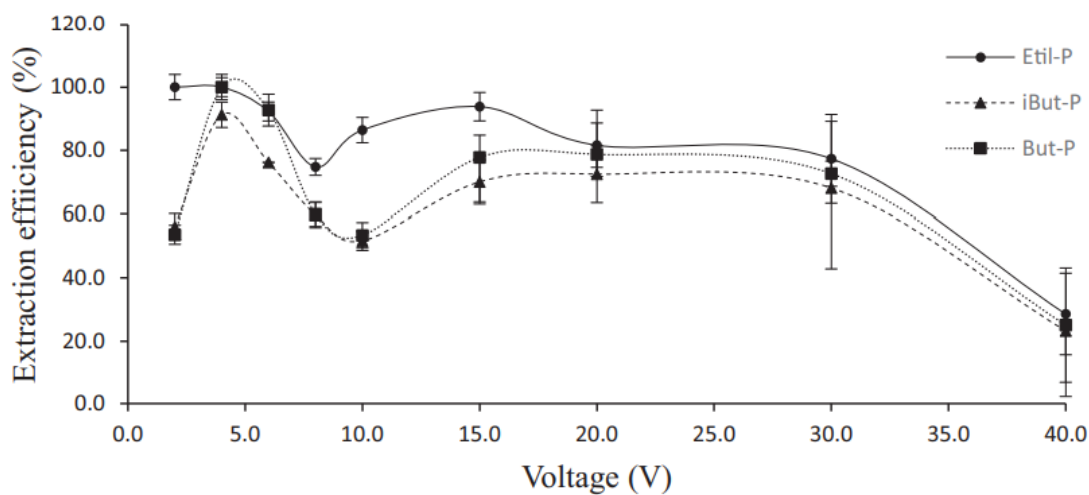


Fig. 16. Voltage optimization. SLM: 1-octanol, flow rate (donor phase): $3 \mu\text{L min}^{-1}$, flow rate (acceptor phase): $1 \mu\text{L min}^{-1}$, donor phase composition: pH 3, acceptor phase composition: pH 11.5

Results and discussion

The remaining parameters such as donor phase pH: 3, acceptor phase pH: 11.5, 4V and a flow rate of 1 and 3 $\mu\text{L min}^{-1}$ for the acceptor phase and donor phase, respectively, were successfully applied to 1:2 diluted urine samples at three different doping concentrations (0.5, 1 and 3 $\mu\text{g/mL}$). The recoveries were above 84% (table 1) for all cases, with excellent clean-up and standard deviations below 6% were found. For the analysis of each of the extraction parameters an Agilent 1100 series HPLC-UV chromatography equipment with a LiChroCART1 75-4 Purosphere STAR RP-18e 3 mm (75 mm \times 4.0 mm i.d.) column was used.

Table 1. $\mu\text{EME/HPLC}$ recoveries (average of three determinations \pm standards deviation) from spiked urine samples.

	Spiked level ($\mu\text{g /mL}$)	Etil-P	iBut-P	But-P	Average current (μA)
Urine sample	0.5	91.7 \pm 3.8	84.4 \pm 5.1	88.4 \pm 6.1	6.8
	1	91.7 \pm 2.1	88.5 \pm 5.4	86.3 \pm 5.8	7
	3	87.1 \pm 4.7	87.3 \pm 3.9	86.5 \pm 3.6	9.4

The reduction and control of the intensity is a very important parameter in the electromembrane extraction technique. Low currents favour a more stable system over time by decreasing electrolysis, removing the formation of bubbles inside the microchannel (table 1). EIS has been demonstrated to be a powerful tool in future microextraction systems. This technique opens a new window of possibility for characterisation and electrical analysis of these microfluidic extraction systems.

EIS technique allows monitoring analyte transfer across the membrane in real time. These measurements (EIS) enable the development of more comprehensive optimisation protocols, because it provides a lot of information about the extraction process previously unknown. In addition, it reduces cost and time in the optimisation processes.

Results and discussion

2.2. An efficient microfluidic device based on electromembrane extraction for the simultaneous extraction of acidic and basic drugs

In this work, we have designed, fabricated and characterised a device that allows simultaneous extraction of acidic and basic analytes in a single step under electromembrane conditions. This design demonstrated to be a significant advance in the development of microfluidic sample pre-treatment platforms.

The proposed device consisted on three PMMA plates of dimensions 35 x 35 x 6 mm (length x width x depth) (fig. 15), manufactured with an Epilog Mini 24-30 W laser (Fig. 17). Channels had a dimension of 15 x 2 x 0.120 mm (length x width x depth) each. Two acceptor solutions of different composition (channel 1 and channel 3) and a common sample solution (channel 2) for both acceptor phases were used. Since two EME were implemented into the microfluidic device, the use of two platinum electrodes (one for each phase) was necessary.

Two acidic compounds (ketoprofen (KTP) and naproxen (NPX)) and two basic compounds amitriptyline (AMP) and loperamide (LRP) were selected as model analytes for the study. Once EME parameters were optimized, the following values were selected as optimal extraction values: 1:1 NPOE-Dodecanol as SLM, pH: 6.5 (10mM phosphate buffer) as common donor phase, pH: 12 (10mM phosphate buffer) as acidic acceptor phase, pH: 1.5 (10mM phosphate buffer) as basic acceptor phase, 5V as common voltage for all compounds and a common flow rate of 1 μLmin^{-1} . Under these conditions, excellent efficiencies within 98-100 % were obtained (Fig. 17).

Results and discussion

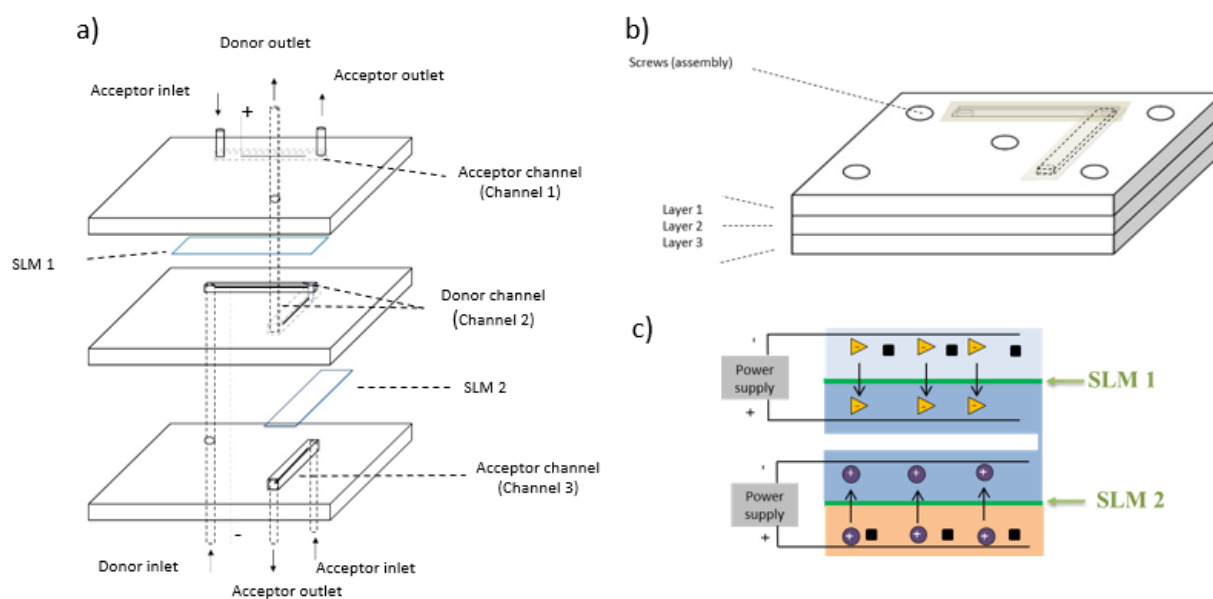


Fig. 17. Scheme of the microfluidic device a) Not assembled, b) Assembled, c) Analytes transfer model.

In addition, the system allowed more than 30 consecutives under low voltage conditions. For the first time, low voltages and currents were possible to carry out high-efficiency extractions. This aspect was a great advantage because the risk of electrolysis is greatly reduced, which plays a significant role in the instability of the system. Furthermore, the design of this device demonstrated to be a versatile microfluidic platform to work which allows different techniques combinations such as EME/EME, LPME/LPME or LPME/EME.

Results and discussion

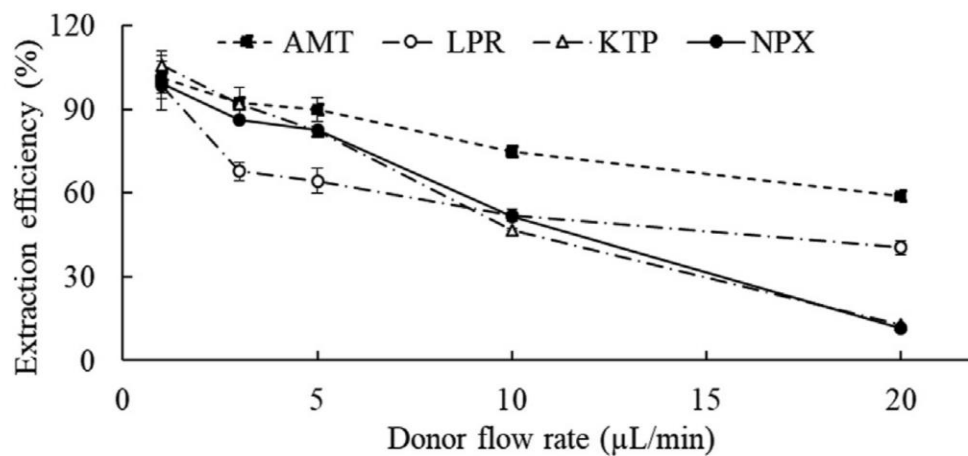


Fig. 18. Donor flow rate optimization. SLM: 1:1 NPOE:Dodecanol. Donor phase composition: 10 mM phosphate buffer pH 6.5. Acceptor phase composition: 10 mM phosphate buffer at pH 1.5 (basic compounds) and 10 mM phosphate buffer at pH 12 (for acidic compounds). Voltage: 5 V.

This microfluidic platform proposed (Fig. 17) was tested on real samples of bovine plasma 1:2 diluted (table 2), and the recoveries obtained exceed 84% with a relative standard deviation of less than 6%. The sample volume required to perform these extractions did not exceed 50 μL , which is also an advantage of this device. On the other hand, only 10 minutes of extraction time were necessary and excellent clean-up was observed.

Results and discussion

Table 2. Extraction efficiencies (average of three determinations \pm standard deviation) from 0.5, 1 and 3 mg L⁻¹ spiked urine samples and bovine plasma samples.

	Spiked level (mg L ⁻¹)	AMT	LPR	KTP	NPX
Urine 1 (non-diluted)	0.5	90.6 \pm 5.9	95.4 \pm 5.1	99.1 \pm 5.6	97.8 \pm 6.2
	1	91.3 \pm 4.1	96.7 \pm 3.8	99.3 \pm 4.4	96.4 \pm 3.9
	3	90.9 \pm 2.1	97.5 \pm 2.0	97.8 \pm 3.0	96.8 \pm 1.0
Bovine plasma (non-diluted)	0.5	88.5 \pm 3.5	83.4 \pm 5.0	45.2 \pm 3.9	nd*
	1	89.7 \pm 3.9	81.5 \pm 7.9	40.3 \pm 2.4	nd*
	3	91.3 \pm 1.6	81.7 \pm 5.1	42.1 \pm 1.5	nd*
Bovine plasma (1:1)	0.5	95.7 \pm 3.2	94.5 \pm 4.2	67.7 \pm 2.3	14.0 \pm 4.2
	1	92.6 \pm 4.4	91.1 \pm 3.3	65.2 \pm 3.3	16.1 \pm 4.0
	3	89.8 \pm 4.1	92.0 \pm 5.2	68.9 \pm 1.6	13.3 \pm 2.1
Bovine plasma (1:2)	0.5	95.5 \pm 3.0	93.2 \pm 1.8	97.9 \pm 2.3	84.0 \pm 5.8
	1	103.6 \pm 5.7	98.4 \pm 4.5	101.1 \pm 3.3	83.8 \pm 6.0
	3	96.1 \pm 5.0	88.5 \pm 2.5	101.5 \pm 4.7	88.4 \pm 4.1

nd: no detected

Finally, the microfluidic device presented in this work based on EME/EME system is compared with previous methodologies for the simultaneous combination of acidic and basic drugs (table 3). Our device μ EME/EME performed extractions with high extraction efficiencies (above 96%) at low voltages (5 V), improving the processes shown in table 3 for the simultaneous extraction of acidic and basic analytes. This system also allowed consecutive extractions and reusing of membrane, with shorter extraction times and lower sample volume than its competitors. Under these terms, this device is considered to have great potential to implement double EME for the simultaneous extraction of analytes of different nature, with minimal sample consumption, using a stable system with low currents (4-5 μ A) in less than 10 minutes.

Results and discussion

Table 3. Comparison of figures of merit for simultaneous extraction of basic and acidic drugs with other setups.

Analytical method	Matrix	Sample Volume (mL)	EF	EE %	Extraction time (min)	Consecutive Extraction	Extraction Voltage (V)	Ref
EME/EME	Wastewater	>4000	59-350	12-76	10	NO	300	29
EME	Urine	24,000	300-350	12-14	14	NO	40	30
Dual EME	Urine and plasma	4000	150-170	17-46	25	NO	40	31
EME	Urine	4000	66-132	33-66	15	NO	50	32
EME/EME (two chips)	Urine and Plasma	1000	15-17	-	33	NO	40/100	33
EME/EME (one chip)	Urine	825	17-19	40-43	33	NO	40	34
EME/LPME	Plasma	600	-	22-43	15	NO	300	37
EME/EME (one chip)	Urine and Bovine Plasma (1:2)	<40	-	96-100, 83-100	8	YES	5	This work

Results and discussion

2.3. Electromembrane extraction using deep eutectic solvents as the liquid membrane.

The following work was carried out during my stay at the Faculty of Pharmacy (University of Oslo) together with my colleague F. Hansen. F. Hansen and myself share the co-authorship of this paper, supervised by Prof. S. Pedersen-Bjergaard. During this time, DES compounds were investigated for the first time as SLM for the extraction of acidic and basic analytes of a wide polarity ($-0.4 < \log P < 5.0$) window. DESs are systems formed from a eutectic mixture of Lewis or Brønsted acids and bases. To make these mixture, one compound must be a hydrogen bond donor (HBD) and the other a hydrogen bond acceptor (HBA). The formation of the hydrogen bond results in a considerable reduction of the melting point of the components, dependent on the molar ratio. The molar ratio with the lowest melting point is called the deep eutectic point. For this work, 4 natural compounds were selected for making DESs mixture (camphor, coumarin, DL-menthol and thymol), and the selection of these compounds was designed to optimise a completely sustainable and environmentally friendly solvent. These DESs were synthesised by mixing the appropriate amounts of HBA and HBD component and then heating them at 80° in an oven for 15 minutes.

Fig. 19 shows a representation of the equipment used in this work. In this case, a *96-well* plate format was used, which consisted of a base plate with 96 wells where 100 μL of sample in each could be tested. 4 μL of solvent were impregnated into the PVDF filters of a commercial 96-well MultiScreen-IP plate of 0.45 mm pore size (Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Ireland). After placing the filter plate in the wells containing the sample, 100 mL of acceptor solution was deposited in the reservoir above the SLM. Finally, a lid with 96 aluminium electrode rods was placed on top of the filter plate and attached to the rest of the set-up. The well-adjusted device was placed on a 900 RPM programmed shaking plate (Vibramax 100, Heidolph, Kellheim, Germany), and the plate with the sample and electrodes were then connected to a power supply to apply a potential. After extraction, the acceptor solutions were collected and analysed by UHPLC.

Results and discussion

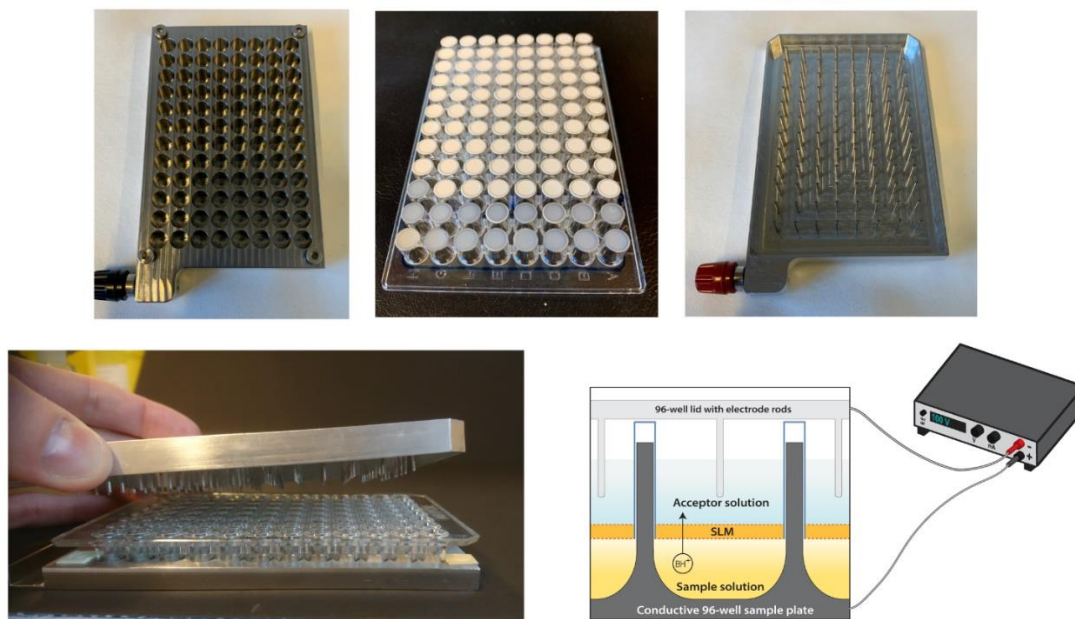


Fig. 19. Photos of EME equipment. Top left-to-right) sample plate, filter plate, acceptor lid with electrode rods. Bottom left) assembled device. Bottom right) cross-sectional illustration of assembled device configured for extraction of basic analytes.

In the present work, we selected four non-ionic components forming hydrophobic deep eutectic solvents at room temperature. The camphor and coumarin compounds were selected as HBA components, while DL-menthol and thymol were selected as HBDs. A scheme of the properties of these compounds is showed in Fig. 20. As seen, coumarin and thymol are aromatic compounds, while on the other hand DL-menthol and thymol are non-aromatic. The mixtures formed in molar ratios of 2:1, 1:1 and 1:2 (HBA:HBD) are listed in table 4. These DESs were synthesised by mixing the appropriate amounts of each HBA and HBD component and then heating them at 80° in an oven for 15 minutes. The selected DES compositions were designed to investigate dispersion-based interactions (cation- π interactions and π -stacking) and hydrogen bonding. Thus, our synthesized DESs could be classified into SLM 1-2 as non-aromatic, SLM 3-8 as

Results and discussion

moderately aromatic, and SLM 9 -11 as highly aromatic. The Kamlet-Taft properties were experimentally determined and summarised in table 4. Therefore, a total of 11 DESs were designed and tested by EME and the efficiencies obtained were compared with two classical solvents from the literature, NPOE for the extraction of basic analytes and 1- octanol for acid analytes. These 11 solvents were studied with 3 different families of compounds: a) papaverine, promethazine, verapamil, amitriptyline, perphenazine and prochlorperazine as model basic non-polar analytes ($\log P$ 2.5 to 5.0); b) ketoprofen, naproxen, flurbiprofen, fenoprofen, diclofenac and ibuprofen as model non-polar acidic analytes ($\log P$ 2.5 to 5.0); and c) tyramine, metaraminol, sotalol, ephedrine, atenolol and metoprolol as model polar basic analytes ($\log P$ -0.4 to 1.8).

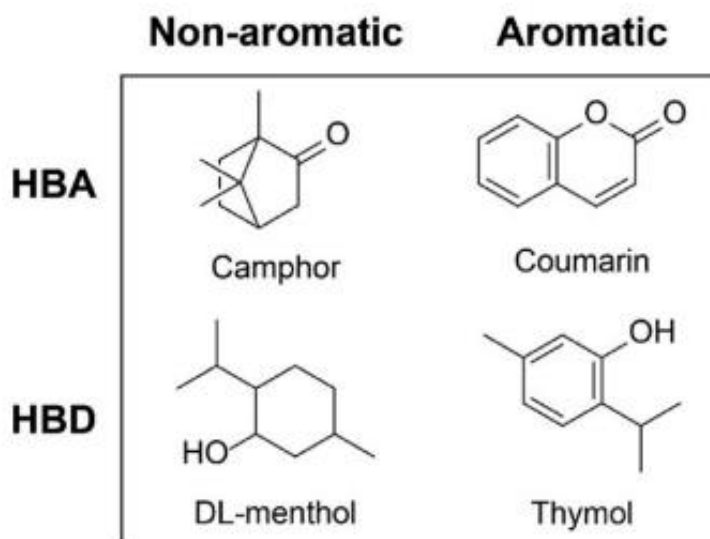


Fig. 20. Chemical structures of the selected DES components.

In order to study the news synthesized SLMs, working conditions were selected according a previously published EME extraction. For these experiments, 75V, 15 min at 900 rpm as extraction time, 50 mM phosphoric acid (pH 2.0) as sample and acceptor solution for basic

Results and discussion

compounds extraction and 50 mM ammonium phosphate (pH 9.0) for acidic compounds extraction were fixed.

DESs were tested on three different families of analytes individually by EME. Firstly, the extraction with 7 basic non-polar analytes was studied and the recoveries obtained are shown in Fig. 21. As seen, recoveries above 75% were obtained when SLMs 1,5,9,10 and 11 were selected as organic solvent, obtaining low efficiency with the rest of the SLMs. Secondly, DESs were tested in the extraction of 6 acidic non-polar analytes. This time, exhaustive efficiencies between 64-100% (Fig.21) were only obtained when the solvents of the coumarin-thymol (SLM 9-11) were used, with inefficient performance for the remaining SLMs Finally, the performance of DESs on 6 polar basic analytes was carry out, as in the previous case, and high throughputs for most compounds were achieved when SLMs based on coumarin-compounds were applied (Fig 22).

Table 4. SLM solvents selected for testing. Camphor:DL-menthol 2:1 mixture was not liquid at room temperature. The Kamlet-Taft properties were determined experimentally

	Composition (molar ratio)	Aromaticity	α	β	π^*
SLM 1	Camphor:DL-menthol 1:1	None	0.37	0.68	0.6
SLM 2	Camphor:DL-menthol 1:2		0.47	0.73	0.59
SLM 3	Camphor:thymol 2:1	Moderate	0.77	0.55	0.66
SLM 4	Camphor:thymol 1:1		0.94	0.51	0.72
SLM 5	Camphor:thymol 1:2		0.87	0.29	0.95
SLM 6	Menthol:thymol 2:1	Moderate	0.75	0.46	0.75
SLM 7	Menthol:thymol 1:1		0.74	0.34	0.89
SLM 8	Menthol:thymol 1:2		0.79	0.22	1.01
SLM 9	Coumarin:thymol 2:1	Very high	0.98	<0.67 ^a	0.98
SLM 10	Coumarin:thymol 1:1		1	<0.62 ^a	1.03
SLM 11	Coumarin:thymol 1:2		0.99	<0.53 ^a	1.1
SLM 12	NPOE	High	~0.0 ^a	High ^a	High ^a
SLM 13	1-octanol	None	0.66	0.83	0.57

^{a)} SLM solvents selected for testing. Camphor:DL-menthol 2:1 mixture was not liquid at room temperature.

The Kamlet-Taft properties were determined experimentally

Results and discussion

The results obtained from these experiments have demonstrated that extractions using the coumarin-thymol mixture improve extraction performance compared to the other solvents tested. In particular, the 2:1 coumarin-thymol membranes provided exhaustive extraction of bases in the range $0.4 < \log P < 5.0$ and acids in the range $2.5 < \log P < 5.0$. Moreover, the efficiencies obtained with this solvent exceeded the values obtained with the classical solvents described in the literature such as NPOE and Octanol. This may be due to a favourable transport of acidic analytes to the acceptor phase based on hydrogen bonding interactions, which is formed at the analyte-SLM interface, whereas the transport of basic analytes may be favoured by dipolar and π -type interactions.

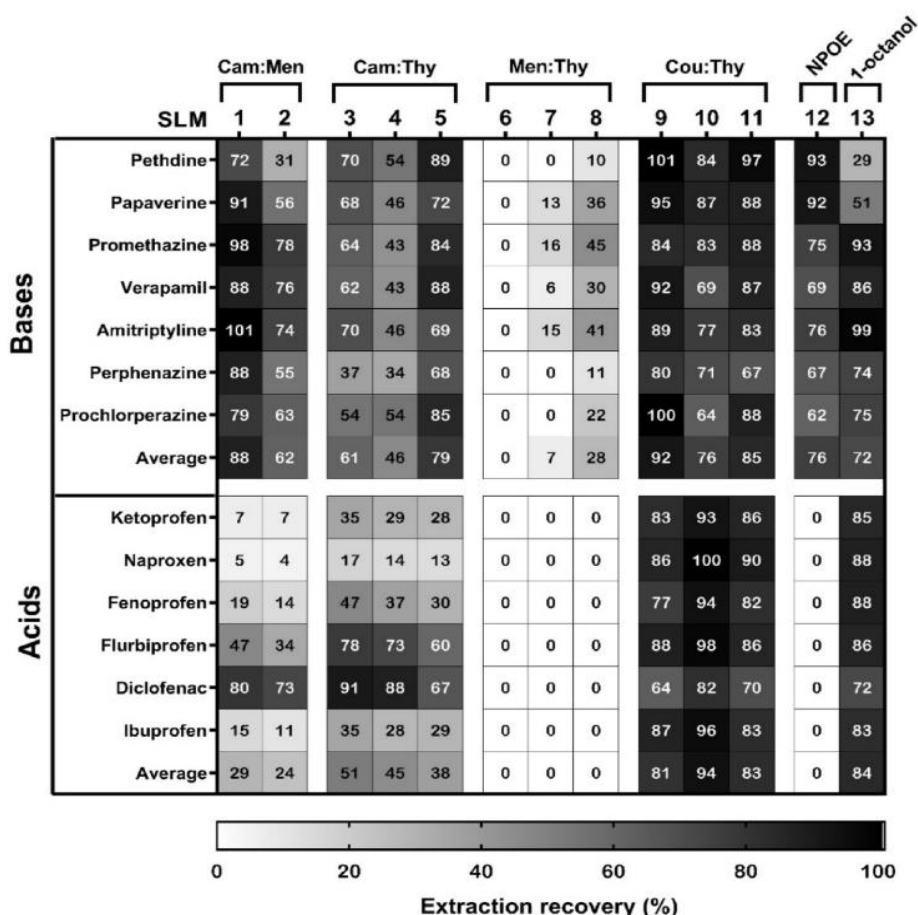


Fig. 21. Extraction recoveries (%) obtained after 15 min of extraction with different SLM compositions. The voltage was 75 V for bases and 35 V for acids. The sample solution was 10 mg/mL for both acids and bases

Results and discussion

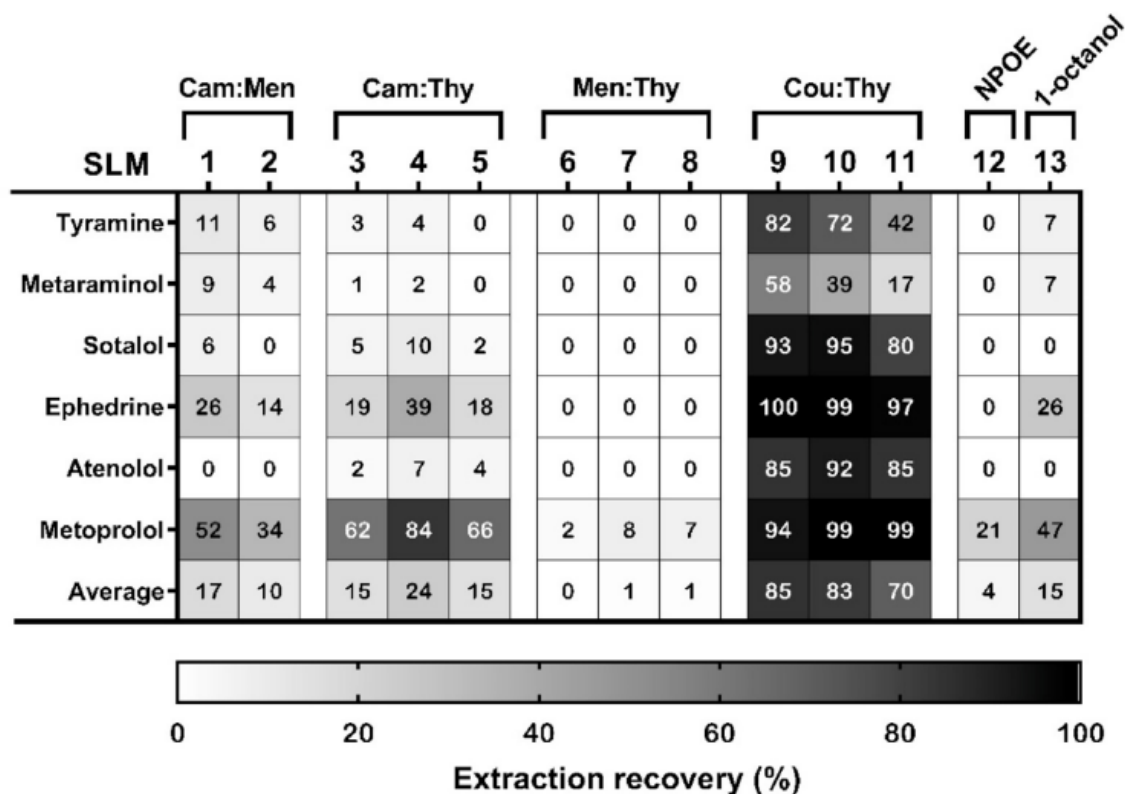


Fig. 22. Extraction recoveries (%) obtained after 15 min of extraction with different SLM compositions.

The voltage was 75 V, and the sample solution was 10 mg/mL in 50 mM phosphoric acid pH 2.0.

Finally, 2:1 coumarin-thymol as SLM was tested on human plasma samples and analysed by UHPLC-MC. Plasma samples were diluted 1:1 and adjusted with 250mM phosphoric acid to pH 2. The extraction was applied for 20 minutes at 75V. Table 5 shows the results obtained from the extraction of polar basic analytes in plasma samples. Excellent recoveries were observed with values between 77-93%, except for Metaraminol (47%). The calibration curves were linear in the range of 0.05 to 100 ng mL⁻¹ with R² > 0.970. The standard deviations(RSD) were between 1.6 to 0.7% (n=6) for all analytes. Moreover, no matrix effect was found in the extraction and excellent clean-up was acquired.

Results and discussion

Table 5. Evaluation data of polar bases extracted for 20 min at 75 V from human plasma diluted 1:1 with 250 mM phosphoric acid. Repeatability (RSD) and matrix effects (%ME) were evaluated at 50 ng mL⁻¹ .

Analyte	Linear range (ng mL ⁻¹) (n = 4)	R2	Recovery	RSD (n =6)	%ME ± SD (n ¼ 4)
Tyramine	1-100	0.982	84%	6.90%	105 ± 6
Metaraminol	1-100	0.970	47%	10.70%	103 ± 2
Sotalol	0.05-75	0.999	86%	1.60%	101 ± 2
Ephedrine	0.05-75	0.996	93%	4.20%	101 ± 3
Atenolol	0.2-75	0.993	77%	5.90%	102 ± 1
Metoprolol	0.05-100	0.995	90%	3.90%	98 ± 2

In this work, 11 deep eutectic solvents have been used for the first time in an EME system that has been designed and optimised based on its Kamlet-Taft properties. 2:1 coumarin-thymol allowed exhaustive individually extractions of basic analytes within the range $-0.4 < \log P < 5.0$ and acidic compounds within the range $2.5 < \log P < 5.0$. This way, for the first time, a common SLM allowed the extraction of acidic and basic compounds of a wide polarity window. Moreover, thanks to the natural origin of its components, an ecological and sustainable extraction system has been developed.

Results and discussion

2.4. Green microfluidic liquid-phase microextraction for polar and non-polar acids from urine

Based on the experiments and conclusions obtained from our previous research, new modifications in our microfluidic platforms were studied with the aim of eliminating drawbacks and promoting eco-sustainability by implementing environmentally friendly solvents in miniaturized systems. In this work, polar and non-polar acidic analytes were simultaneously extracted using two different SLMs based on eutectic solvents and classical solvents. The extractions with both cases were satisfactory and high extraction efficiencies were obtained. As previously described, eutectic solvents (DES) are compounds that are solids at room temperature and that decrease their melting temperature when mixed with another eutectic solvent. The aim of this work is to simultaneously extract compounds of an acidic nature with very different polarities in a single step, and which in turn becomes a system that contributes to “green chemistry”.

The platform used in this study was a microfluidic device integrating LPME as extraction technique. Under LPME conditions, the mass transference comes from passive diffusion produced by a pH gradient between the two phases (sample/donor and acceptor). In this case, the analytes (in their neutral form) from a donor phase are extracted through the SLM, to an acceptor phase (in their ionised form).

The device (Fig. 24) for both studies consisted of two symmetrical PMMA plates, containing one channel each with dimensions: 23 x 3 x 0.13 mm (length x width x depth). The supported liquid membrane (DES or classic solvent) was located between the two microchannels. The acceptor and donor phases were introduced into microchannels through two Teflon tubes by two micro-syringe pumps. Finally, four model acidic analytes with different polarities between $0.5 < \log P < 3.6$ (hippuric acid (HIP), anthranilic acid (ANT), ketoprofen (KTP), naproxen (NPX)) were selected for the optimisation.

Results and discussion

The extraction parameters were optimized in all cases. For DESs study, the optimal conditions were: camphor-menthol 1:1 as SLM, pH 2 as donor solution, pH 11.5 as acceptor solution and a flow rate of $1 \mu\text{L min}^{-1}$ (for both, donor and acceptor solutions). Fig. 21. shows the flow rate optimisation (between 0.5 to $10 \mu\text{L min}^{-1}$) using this green solvent (camphor-menthol 1:1). and achieving high recoveries when flow rates of 0.5 and $1 \mu\text{L min}^{-1}$ were tested. These efficiencies decreased as the flow rate increased, due to the reduction of the SLM-sample contact time.

On the other hand, a similar study for 1-Decanol SLM was carried out. In this study, flow rates between 1 - $10 \mu\text{L min}^{-1}$ under optimal extraction conditions (donor pH: 2, acceptor pH: 10.5 and acceptor flow rate of $1 \mu\text{L min}^{-1}$) were tested. The results obtained in this experiment were very similar to those obtained with the DES. Once more, the same phenomenon of decreasing efficiencies as the donor flow rate increases was observed in this study.

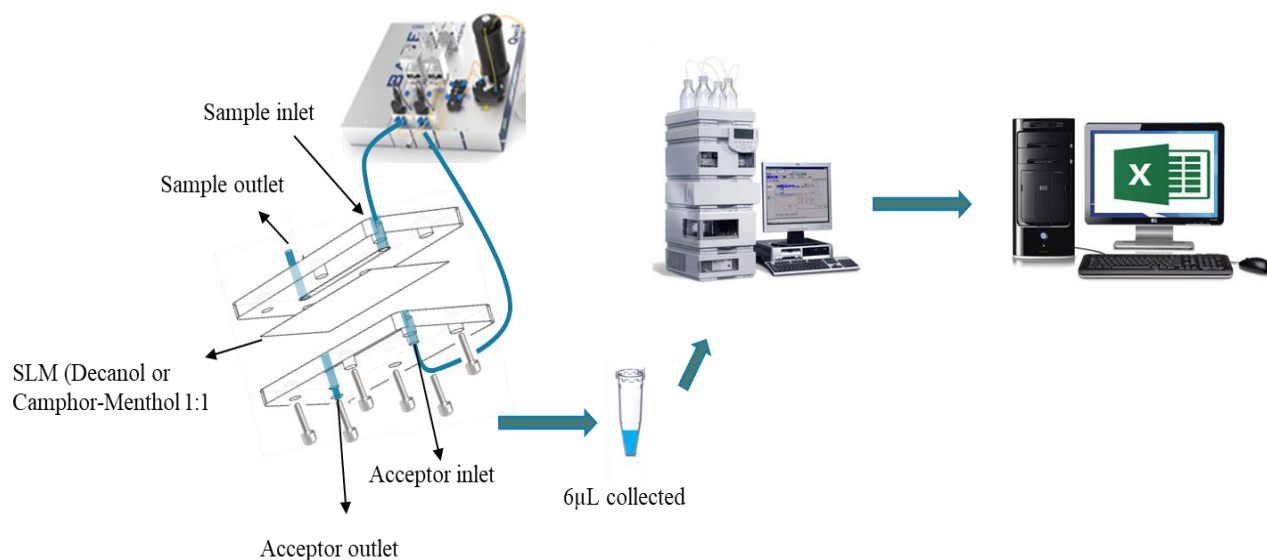


Fig. 23. Scheme of the methodology of microfluidic extraction based in liquid-phase microextraction.

Results and discussion

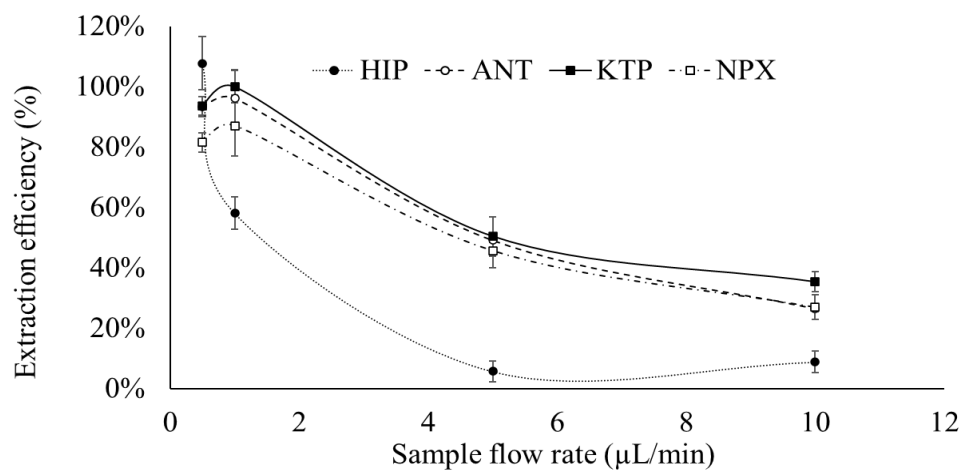


Fig. 24. Extraction efficiency versus donor flow rate. SLM: camphor-menthol 1:1, acceptor phase pH 11.5, donor phase pH 2, acceptor flow rate: $1 \mu\text{L min}^{-1}$

Both membranes were tested in a parallel stability study and this experiment allowed to determine the lifetime of each membrane. After these experiments, a total of 6 and 5 consecutive hours of extraction for Decanol and camphor-menthol 1:1 were determined, respectively.

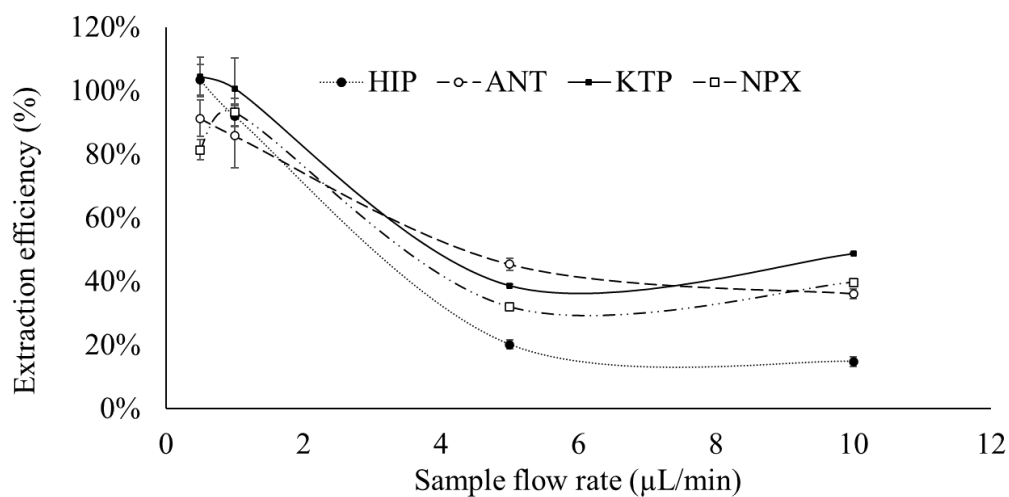


Fig. 25. Extraction efficiency versus donor flow rate. SLM: camphor-menthol 1:1, acceptor phase pH 10.5, donor phase pH 2, acceptor flow rate: $1 \mu\text{L min}^{-1}$

Results and discussion

In order to improve the 58% EE for HIP when DES was used as SLM, different depth dimensions were studied. After analysis of the results, it is found that the device described above was the most optimal one (Fig.20).

Finally, these optimal extraction parameters were tested in urine samples from two 29-year-old women using different dilutions. Recoveries above 72% with deviations below 10% for all cases were obtained. As a final conclusion, a good alternative from this organic solvent (camphor-menthol 1:1) is evident from the recoveries obtained (72-100%) when compared to the best classical solvent Decanol (82-100%).

Table 6. Recoveries (average of three determinations \pm standard deviation) from 1 mg L⁻¹ spiked urine samples for decanol and camphor-menthol 1:1 as SLM

Samples	SLM	HIP	ANT	KTP	NPX
Urine 1 (non-diluted)	Decanol	84.2 \pm 6.7	100.2 \pm 10.3	81.6 \pm 3.8	90.6 \pm 3.3
Urine 1 (1:1 dilution)	Decanol	108.2 \pm 2.3	102.0 \pm 4.0	84.7 \pm 3.8	92.7 \pm 1.0
Urine 1 (non-diluted)	Camphor-menthol 1:1	74.5 \pm 1.6	82.2 \pm 4.2	71.4 \pm 1.0	81.2 \pm 2.2
Urine 1 (1:1 dilution)	Camphor-menthol 1:1	103.7 \pm 2.2	87.5 \pm 1.1	79.6 \pm 2.3	88.2 \pm 3.2
Urine 2 (non-diluted)	Decanol	83.2 \pm 3.6	100.2 \pm 1.2	87.7 \pm 3.3	95.8 \pm 2.4
Urine 2 (1:1 dilution)	Decanol	102.5 \pm 1.5	103.0 \pm 1.8	91.8 \pm 2.5	101.4 \pm 1.1
Urine 2 (non-diluted)	Camphor-menthol 1:1	80.7 \pm 1.6	85.4 \pm 3.6	71.4 \pm 1.9	82.4 \pm 4.0
Urine 2 (1:1 dilution)	Camphor-menthol 1:1	100.8 \pm 5.2	93.7 \pm 1.0	73.4 \pm 1.6	88.3 \pm 3.0

This experiment demonstrated that DES (camphor-menthol 1:1) can extract compounds in a wide polarity window. This surprising result provided a wide versatility to LPME, driving this technique to be applied in microfluidic devices towards completely environment friendly extractions.

Results and discussion

2.5. A microfluidic method for the simultaneous extraction of polar and non-polar basic analytes from urine samples (under revision)

The work presented below is current under review in the journal (ACA), thus the paper submitted to this journal is shown without modification.

A microfluidic method for the simultaneous extraction of polar and non-polar basic analytes from human urine

Elia Santigosa^a, Pablo Giménez-Gómez^b, Stig Pedersen-Bjergaard^{c,d}, María Muñoz^a,
María Ramos-Payán^{e,*}

^a*Department of Analytical Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

^b*Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM, CSIC), Bellaterra (Barcelona), 08193, Spain*

^c*Department of Pharmacy, University of Oslo, P.O. Box 1068 Blindern, 0316 Oslo, Norway*

^d*Department of Pharmacy, Faculty of Health and Medical Sciences University of Copenhagen, Universitetsparken 2, 2100 Copenhagen Ø, Denmark*

^e*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Seville, c/Prof. García González s/n, 41012, Seville, Spain*

*Corresponding author: ramospayan@us.es

Results and discussion

Abstract

In sample preparation, simultaneous extraction of analytes of very different polarity from biological matrixes represents a challenge. In this work, verapamil hydrochloride (VRP), amitriptyline (AMP), tyramine (TYR), atenolol (ATN), metopropol (MTP) and nortriptyline (NRP) were used as basic model analytes and extracted simultaneously from urine samples by liquid-phase microextraction (LPME) in a microfluidic device. The model analytes (target compounds) are pharmaceuticals with $-0.4 < \log P < 4.9$. Different organic solvents and mixtures of them were investigated as supported liquid membrane (SLM), and a mixture of 2:1 (v/v) tributyl phosphate (TBP) and dihexyl ether (DHE) was found to be highly efficient for the simultaneous extraction of the non-polar and polar model analytes. TBP reduced the intrinsic hydrophobicity of the SLM and facilitated extraction of polar analytes, while DHE served to minimize trapping of non-polar analytes. Sample and acceptor phase composition were adjusted to pH 12 and pH 1.5, respectively. Urine samples were pumped into the microfluidic system at $1 \mu\text{L min}^{-1}$ and extraction was completed in 7 min. Recoveries exceeded 78 % for the target analytes, and the relative standard deviation (n=4) was below 7 % in all cases. Using five microliters of SLM, the microfluidic extraction system showed good long-term stability, and the same SLM was used for more than 18 consecutive extractions.

Keywords: microfluidic, liquid phase microextraction, supported liquid membrane, basic drugs, urine samples

2.5.1. Introduction

In the last decade, liquid phase microextraction (LPME) systems have been investigated and developed with the aim of minimizing the use of hazardous organic solvent. Liquid phase microextraction is a widely used technique for the treatment of samples and has been conducted in different formats, such as dispersive liquid-liquid extraction (DLLE) [1-3], hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) [4-6], single drop microextraction (SDME) [7-9], and

Results and discussion

electromembrane extraction (EME) [10-12]. LPME has been successfully applied to both biological and environmental samples and there are two different modes of work depending on the nature of one of the phases. The analyte is extracted from the sample to a microliter volume of acceptor, which can be an organic solvent [13-14] or an aqueous solution [15-16]. In the analytical field, sample pre-treatment systems are commonly used as a cleaning, preconcentration and extraction procedure. In addition, the development of improvements in these procedures and the advantages they present have attracted the interest of the scientific community, not only for their development but also using these systems as a routine procedure. LPME [17-19] and EME [20-22] are well-known techniques and have been developed extensively, especially for biomedical and environmental applications [23-26]. Both LPME and EME provide pre-concentration and efficient sample clean up.

In both LPME and EME, analytes are extracted across a supported liquid membrane (SLM), which is a microliter volume of organic solvent immobilized by capillary forces in the pores of a polymeric membrane. The chemical composition of the SLM play a central role in both LPME and EME, and different solvents are used for different analytes depending on their acid/base properties and based on their polarity [27-33]. Therefore, simultaneous extraction of bases and acids, or simultaneous extraction of polar and non-polar analytes, represent a challenge. The EME system has been shown to be a good option for the simultaneous extraction of acids and bases [34-36]. These systems have been optimized mainly for compounds of similar polarity, providing enrichment factors of between 300-350 [34], 76-130 [35] and good recoveries (60-80%), but the latter requiring extraction times of 45 min. [36]. In these cases, different SLMs have been used for acidic or basic compounds sharing the same donor phase. Furthermore, EME has been previously studied for the extraction of compounds of different polarity, either for acidic or basic compounds using a different membrane according to acidity and polarity [37]. The use of eutectic solvents proved to be an option for the extraction of compounds of different polarity using different SLMs and obtaining efficiencies higher than 85%.

In the last years, LPME [38-41] and EME [42-47] have been successfully implemented in microfluidic devices, requiring less sample and organic solvent. Due to very short diffusion

Results and discussion

distances and operation under dynamic conditions, kinetics are fast and recoveries are high in microfluidic devices. Simultaneous extraction of acids and bases, and polar and non-polar bases, have been reported with electromembrane extraction under microfluidic conditions [48,49]. However, there are no studies on simultaneous microfluidic LPME of basic pharmaceuticals within a large log P window and six different basic drugs have been selected for the study: verapamil hydrochloride (VRP), amitriptyline (AMP), tyramine (TYR), atenolol (ATN), metopropol (MTP) and nortriptyline (NRP). Their therapeutic dose is: 0.1-1, 0.02-0.2, 0.05-0.3, 30-200, 0.01-0.25 µg/mL for ATN, NRP, AMP, MTP and VRP, respectively.

For this reason, in this work, an efficient microfluidic method is proposed for simultaneous liquid-phase microextraction of polar and non-polar pharmaceuticals from microliter volumes of human urine samples. The composition and polarity of the supported liquid membrane was developed and tuned carefully to facilitate extraction in a large log P window. Operational parameters were optimized, and the method was evaluated for basic pharmaceuticals in the log P range -0.4 to 4.9.

2.5.2. Experimental

2.5.2.1 Chemicals and sample solutions

Formic acid, hydrochloric acid, sodium hydroxide, methanol, 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE), 1-octanol, 1-decanol, dihexyl ether (DHE), tributyl phosphate (TBP), verapamil hydrochloride (VRP), amitriptyline hydrochloride (AMP), tyramine (TYR), atenolol (ATN), metopropol (MTP), and nortriptyline (NRP) were purchased from Fluka_Sigma_Aldrich (Madrid, Spain). A Celgard 2500 membrane of 25 µm thickness, 55 % porosity, and 0.21 x 0.05 µm pores was obtained from Celgard (Charlotte, NC, USA). 100 mg L⁻¹ stocks solutions for all analytes were prepared in methanol. All daily working dilutions were prepared using ultrapure water from a Milli-Q Plus (Elga, Purelab option S-R 7-15) (Madrid, Spain).

Results and discussion

2.5.2.2 Liquid chromatography

An Agilent 1100 series (Barcelona, Spain) liquid chromatography apparatus equipped with a G1312A Bipump system was used for liquid chromatography. This was equipped with a STAR RP-18e column (75 mm × 4.0 mm × 3 μm) from VWR (Barcelona, Spain), and a Kromasil1 100 A C18 (20 mm × 4.6 mm × 5 μm) guard column from Scharlab S.L. (Barcelona, Spain). Column temperature was 30°C. An autosampler G1313A was used for sample injection (5 μL). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid (pH 2.6) (component A) and methanol (component B) at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. An initial elution gradient was programmed as follows: from 0 % to 2 % B for 2 min, then from 2% B to 100% B for another 27 min, this condition was kept for 2.5 min, followed by 5 min re-equilibration. The wavelengths used for DAD was 200 nm for all compounds. Chromatogram were completed in 29 min and retention times were 3.4, 9.8, 17.9, 25.5, 27.6 and 28.1 min for TYR, ATN, MTR, VRP, NRP and AMP, respectively.

2.5.2.3 Fabrication and setup of the microfluidic device

An Epilog Mini 24–30-W laser cutter was used for the device fabrication, under ablation conditions of 40% for writing speed and power, a resolution of 1500, and a frequency of 5000, as described in our previous work Santigosa *et al.* [40] (Fig. 26). The device contained two channels each of 25.0 × 3.0 × 0.13 mm (length × width × depth), on two poly(methyl methacrylate) (PMMA) layers. Two inlets/outlet Teflon tubes (1.5 mm od and 0.12 mm i.d) were located at the ends of the channels, the acceptor and sample solutions were introduced through two holes where the tubes were placed. A 28 mm length × 5 mm width piece of flat polypropylene (PP) membrane (25 μm thickness, 55 % porosity) was used to separate the acceptor channel and the sample channel. PP was impregnated with 5 μL of TBP:DHE (2:1, v/v) using a micropipette. Inlets Teflon tubes were connected to two separate micro-syringe pumps (Cetoni GmbH, Korbussen, Germany). Acceptor (pH 1.5) and sample (pH 12.0) solutions were pumped into the microfluidic channels at 1 μL min⁻¹. The extraction was completed in 7 minutes, and acceptor phase was collected by a micropipette and transferred to a micro-insert for its analysis by liquid chromatography.

Results and discussion

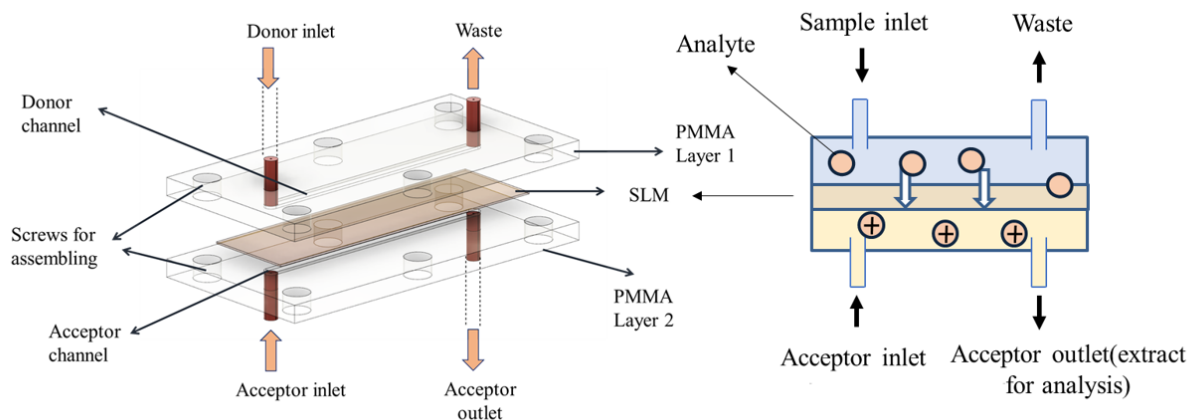


Fig. 26. Microfluidic device scheme.

2.5.2.4 Preparation of real samples

Non-diluted and 1:1 diluted urine samples from a 29-year-old female volunteer (prior consent) were spiked with model analytes at three different levels (0.75, 1 and 2 mg L⁻¹). All samples were adjusted to pH 12.0 (with NaOH) and filtered through Pall Nylaflo™ nylon membrane filter 0.45 μm (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA) prior to extraction. The samples were delivered into the microfluidic system at 1 μL min⁻¹ requiring a final sample volume amount below 100 μL for at least 5 repetitive extractions.

2.5.3. Results and discussion

2.5.3.1 Theoretical considerations

Polar and non-polar model analytes were extracted from aqueous sample pH 12, through organic SLM, and into aqueous acceptor pH 2. For a given analyte, the following partition coefficients controlled the process:

$$K_1 = \frac{C_{eq,SLM}}{C_{eq,s}} \quad (1)$$

Results and discussion

$$K_2 = \frac{C_{eq,a}}{C_{eq,SLM}} \quad (2)$$

$C_{eq,SLM}$, $C_{eq,s}$ and $C_{eq,a}$ are the analyte equilibrium concentrations in the SLM, sample and acceptor, respectively. The overall analyte partition coefficient K between the donor and acceptor can be expressed as the product of K_1 and K_2 :

$$K = \frac{C_{eq,a}}{C_{eq,s}} = K_1 \times K_2 \quad (3)$$

The analyte extraction recovery at equilibrium is related to the partition coefficients as expressed in the following equation :

$$R (\%) = \frac{K \times V_a}{K \times V_a + K_1 \times V_{SLM} + V_s} \times 100 \% \quad (4)$$

V_a , V_s , and V_{SLM} denote the volumes of acceptor, sample, and SLM, respectively. Analyte kinetics are controlled by K_1 , and can be modelled using the following equation [50]:

$$C_s(t) = C_s^0 \cdot \exp\left(-\frac{A_{SLM} D_{SLM} K_1}{V_s h} t\right) \quad (5)$$

Here, $C_s(t)$ is the analyte concentration in the donor as a function of time, C_s^0 is the initial analyte concentration in the donor ($t = 0$), A_{SLM} is the surface area of the SLM, h is the thickness of the SLM, and D_{SLM} is the diffusion coefficient of the analyte in the SLM. The following discussions of experimental work are anchored in Equations (1)-(5).

2.5.3.2 Supported liquid membrane selection

In the first series of experiments, the composition of the supported liquid membrane was studied. Five different organic solvents were selected as SLM for simultaneous extraction of polar and non-polar basic compounds based on previous work [32,33,40]: 1-octanol, 1-decanol, NPOE, DHE and TBP. As well-known for LPME of basic analytes, the compounds must be in their neutral form in the sample and positively charged in the acceptor phase. This way, analytes are extracted from the sample to the acceptor phase through the SLM. Table 7 shows the molecular structure,

Results and discussion

log P and pKa of model analytes. The preliminary conditions of the rest of the parameter were selected based on the literature for the extraction of these compounds and their pKa value [33]. Thus, 5 mM of phosphate buffer pH 2.0 was used as acceptor, and 5 mM phosphate buffer pH 12.0 spiked with model analytes at 3 mg L⁻¹ was used as sample. Both acceptor and sample were pumped at 1 μL min⁻¹. Table 8 summarizes the extraction efficiencies obtained with each of the tested solvents.

Table 7. Extraction efficiencies (RSD %) of the polar and non-polar basic using different organic solvents as the SLM for μLPME-chip device.

Drug	Structure	log P	pKa
Verapamil		5.04	9.68
Amitriptyline		4.81	9.76
Tyramine		0.68	9.66 ^{base} /10.41 ^{acid}
Atenolol		0.42	9.67
Metoprolol		1.75	9.67
Nortriptyline		4.43	10.47

Results and discussion

Tabla 8. . Recoveries (RSD %) of the polar and non-polar basic using different organic solvents as the SLM for μ LPME-chip device.

SLM	Extraction efficiency \pm SD (%)					
	TYR	ATN	MTP	VRP	NRP	AMP
Octanol	70.0 \pm 6.0	78.6 \pm 4.3	75.4 \pm 1.8	50.4 \pm 4.6	41.3 \pm 3.3	43.8 \pm 3.6
Decanol	25.3 \pm 0.9	36.7 \pm 3.0	45.6 \pm 2.1	80.4 \pm 4.5	79.1 \pm 4.2	82.7 \pm 6.9
NPOE	0.0 \pm 0.0	31.9 \pm 2.4	62.5 \pm 6.1	87.1 \pm 4.8	75.6 \pm 4.4	95.2 \pm 5.5
DHE	5.7 \pm 1.4	24.4 \pm 5.0	60.4 \pm 2.7	72.7 \pm 3.2	55.3 \pm 3.4	39.5 \pm 4.9
TBP	67.6 \pm 7.8	80.8 \pm 6.4	53.7 \pm 4.3	31.3 \pm 4.6	71.5 \pm 3.2	7.7 \pm 2.5
1:1 TBP:NPOE	16.1 \pm 1.5	27.5 \pm 1.7	48.6 \pm 2.8	77.8 \pm 5.9	68.7 \pm 4.5	43.3 \pm 1.2
2:1 TBP:NPOE	30.2 \pm 1.7	39.4 \pm 2.5	49.3 \pm 4.4	94.9 \pm 1.9	72.4 \pm 2.9	55.3 \pm 6.8
1:2 TBP:NPOE	0.0 \pm 0.0	27.5 \pm 1.7	52.0 \pm 1.7	55.3 \pm 1.2	43.0 \pm 1.6	45.2 \pm 2.8
3:1 TBP:NPOE	30.3 \pm 2.8	64.8 \pm 7.0	74.3 \pm 1.9	89.8 \pm 5.4	83.9 \pm 4.6	53.8 \pm 4.9
1:3 TBP:NPOE	0.0 \pm 0.0	1.8 \pm 3.9	94.8 \pm 4.6	99.3 \pm 4.5	83.7 \pm 2.2	88.9 \pm 3.5
1:1 TBP:DHE	56.5 \pm 5.6	52.2 \pm 5.9	75.1 \pm 5.5	79.6 \pm 6.2	65.6 \pm 3.6	25.0 \pm 6.1
2:1 TBP:DHE	78.6 \pm 3.5	92.8 \pm 4.6	87.2 \pm 6.8	97.2 \pm 3.3	91.4 \pm 3.4	64.5 \pm 5.2
1:2 TBP:DHE	15.9 \pm 1.3	21.3 \pm 1.4	80.4 \pm 3.5	78.2 \pm 3.7	51.2 \pm 2.0	49.5 \pm 1.9
3:1 TBP:DHE	55.1 \pm 5.9	83.7 \pm 6.3	102.4 \pm 5.4	84.1 \pm 3.2	42.0 \pm 1.7	51.3 \pm 5.7
1:3 TBP:DHE	0.0 \pm 0.0	21.9 \pm 4.4	81.9 \pm 6.9	74.9 \pm 1.1	61.9 \pm 2.3	74.8 \pm 2.5

1-Octanol (OCT, log P = 3.0) was tested as the first SLM. With this solvent, K_1 and K_2 were calculated for the model analytes based on computer software [50], and from these values theoretical equilibrium recoveries were estimated based on Equation (4) (Table 9). For the polar analytes (tyramine, atenolol, and metoprolol), K_1 -values were low. The theoretical equilibrium recoveries are very close to 100 %, while the experimental values ranged between 70 and 79 %. This indicated that the polar analytes were not extracted completely to equilibrium for kinetic

Results and discussion

reasons. For the non-polar analytes, K_2 -values were low, and theoretical recoveries were calculated to 30-43 %. The experimental values ranged between 41 and 50 %. Kinetics were faster for these analytes, but recoveries were limited by trapping in the SLM (K_2 -limitation).

When OCT ($\log P = 2.58$) was replaced by 1-decanol (DEC, $\log P = 3.47$), the intrinsic hydrophobicity of the SLM increased, while the number of hydrogen bond sites remained the same ($HBA = HBD = 1$). Therefore, K_1 -values decreased in general. The polar analytes now suffered from poor transfer into the SLM (K_1 -limitation), while the non-polar analytes improved due to increased K_2 -values. In subsequent experiments, we also tested dihexyl ether (DHE, $\log P = 4.55$), 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE, $\log P = 4.86$), and tributyl phosphate (TBP, $\log P = 4.09$) as SLMs. With DHE, the intrinsic hydrophobicity was even higher than with DEC, and the solvent has a single HBA site. For this reason, K_1 -values were low, and all the analytes suffered from slow kinetics (K_1 -limitation). When DHE was replaced by NPOE, the intrinsic hydrophobicity increased slightly, but the number of HBA sites increased from one to three, and the aromatic ring count changed from zero to one. The polar analytes still suffered from K_1 -limitation with NPOE, owing to hydrophobicity, but due to hydrogen bond and π -type interactions, the non-polar analytes were extracted with high recoveries. When NPOE was replaced by TBP, the intrinsic hydrophobicity decreased and the number of HBAs increased to four. K_1 -values increased significantly, the polar analytes were extracted with high recovery, while the non-polar analytes now suffered from low K_2 -values (K_2 -limitation).

As illustrated in the discussion above with pure solvents, the extraction efficiency for a given analyte depends on the hydrophobicity of the solvent and the number of functional groups. Increasing the intrinsic hydrophobicity decreases K_1 -values (and increases K_2), while increasing the number of functional groups increases K_1 (and decreases K_2). For high recovery, K_1 and K_2 have to be balanced. Due to this, and because the analytes were within a very broad $\log P$ -range, we tested binary mixtures of TBP and NPOE, and TBP and DHE (Table 9). The mixtures of TBP and NPOE all provided low recoveries for the polar analytes, due to high intrinsic hydrophobicity caused by NPOE. Very interestingly, the 2:1 ratio of TBP and DHE provided high recoveries (> 60 %) for all the analytes, regardless of polarity. This SLM clearly balanced hydrophobicity and the activity of

Results and discussion

functional groups, in such way that both K_1 - and K_2 -limitations were avoided for the analytes with $0.4 < \log P < 5.0$. Clearly, this is a fine balance, as evidenced by the observation that the performance of the mixtures of TBP and DHE were highly dependent of the compositional ratio of the binary mixture. The TBP and DHE mixture in ratio 2:1 was used in subsequent experiments.

table 9. Calculated values for K_1 , K_2 , K , and recovery with 1-octanol as SLM.

	K_1	K_2	K	Recovery (%)
Tyramine	0.29	89	26	99
Atenolol	2.6	$6.6 \cdot 10^2$	$1.7 \cdot 10^3$	99
Metoprolol	57	30	$1.7 \cdot 10^3$	99
Nortriptyline	$2.7 \cdot 10^4$	0.065	$1.7 \cdot 10^3$	30
Amitriptyline	$6.3 \cdot 10^4$	0.49	$3.2 \cdot 10^3$	43
Verapamil	$1.1 \cdot 10^5$	0.029	$3.2 \cdot 10^3$	30

V_s and V_a was set to 15 μL , and V_{SLM} was set to 1 μL

2.5.3.3 Acceptor and sample composition

In the following experiment, the composition of the acceptor and sample was optimised. Due to the great difference that exists between the pH of both phases, the stability of the extraction was tested with and without buffer. The effect of phosphate buffer was studied by carrying out different extractions at different buffer concentrations (0 mM, 5 mM, 10 mM and 20 mM). It was observed that the pH changed during the extraction when no buffer was used, however, no change was observed in the pH when using phosphate buffer during the extraction. Maintaining a stable pH during extraction improved extraction efficiencies and reproducibility of the system. On the other hand, the highest recoveries were obtained with 5 mM phosphate buffer

Results and discussion

(79-85%), while efficiencies decreased as the concentration of buffer was increased. Therefore, a concentration of 5 mM of phosphate buffer was set to study the effect of pH.

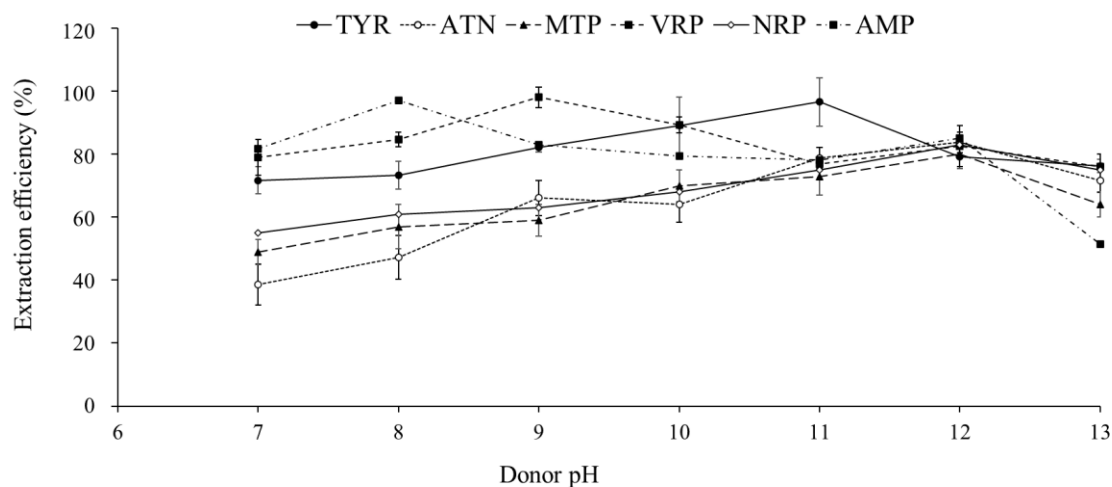


Fig. 27. Optimization of sample composition. SLM: 2:1 TBP:DHE, 5 mM phosphate buffer (pH 2) as acceptor, flow rate: $1 \mu\text{L min}^{-1}$ (acceptor and sample).

In following experiments, sample pH was tested between 6.0 and 12.0, while the acceptor was fixed at pH 2 to keep the analytes positively charged. Fig. 27 shows recoveries as function of sample pH. Due to low log P and high pKa, recovery of ATN increased with increasing pH in the sample up to 12.0. At this pH, the other model analytes still were extracted with high recoveries, and pH 12.0 was selected as the final sample pH. The acceptor pH was studied between 1.0 and 4.0, while sample pH was constant at 12.0 (Fig. 28). The highest recoveries were obtained between pH 1.0 and 1.5, and pH 1.5 was selected for subsequent experiments. All experiments with different sample and acceptor pH were studied in triplicate ($n=3$) with relative standard deviation below 7% for all model analytes.

Results and discussion

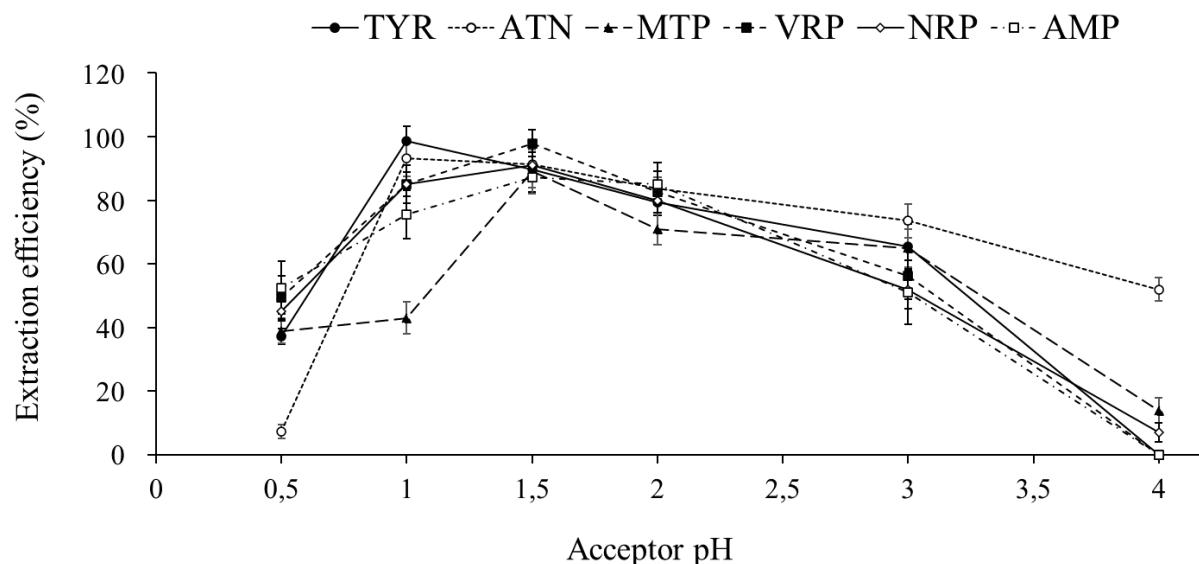


Fig. 28. Optimization of acceptor composition. SLM: 2:1 TBP:DHE, 5 mM phosphate buffer (pH 12) as sample, flow rate: $1 \mu\text{L min}^{-1}$ (acceptor and sample).

2.5.3.4 Sample flow rate

Sample flow rate was investigated under optimal experimental conditions as described above. The sample flow rate was tested between 0.5 and $20 \mu\text{L min}^{-1}$ while the acceptor flow rate was kept constant at $1 \mu\text{L min}^{-1}$. As seen in Fig. 29, recoveries decreased significantly when increasing the sample flow, and with the highest efficiency at 0.5 and $1 \mu\text{L min}^{-1}$. A flow rate of $1 \mu\text{L min}^{-1}$ was selected in order to decrease the extraction time prior analysis by HPLC. Under optimal conditions, recoveries between 84 and 100 % were obtained. Each experimental point was tested in triplicate with relative standard deviation below 6% at low flow rate below $5 \mu\text{L min}^{-1}$. However, the relative standard deviation increased when at flow rate above $5 \mu\text{L min}^{-1}$, due to decreased SLM stability. The effect of carry-over was studied using different membranes and the same membrane in consecutive extractions without observing significant changes in the extraction efficiency of the collected acceptor phase. Under optimal conditions with $1 \mu\text{L min}^{-1}$ sample flow, the SLM was used for 18 consecutive extractions, and with relative standard deviations between

Results and discussion

6-7 %. After 18 extractions, the membrane must be filled with more organic solvent since the extraction efficiency decreases and an increase of RSD was also observed.

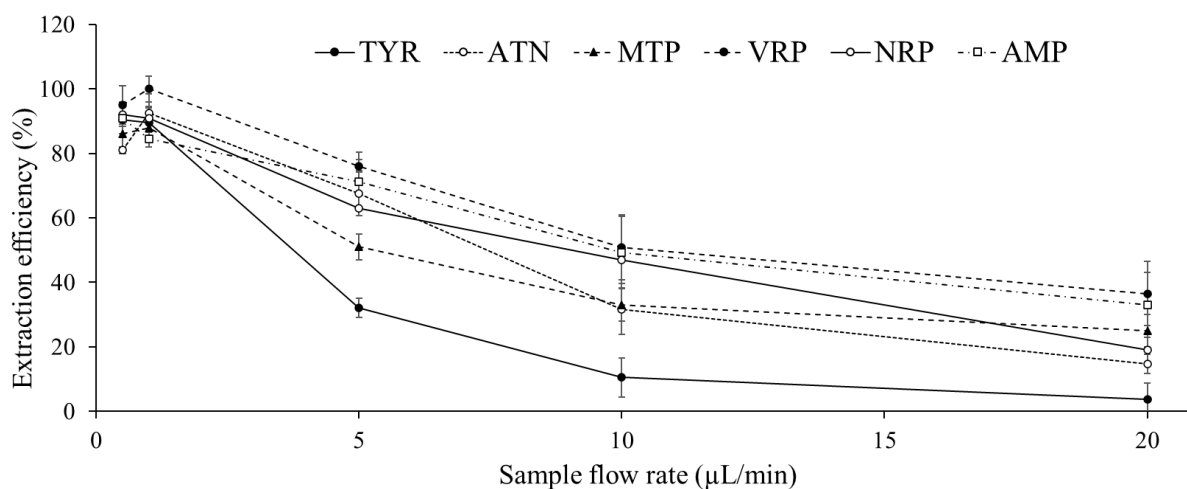


Fig. 29. Recovery versus sample flow rate. SLM: 2:1 TBP:DHE, 5 mM phosphate buffer (pH 1.5) for acceptor phase and 5 mM phosphate buffer (pH 12) for sample solution, flow rate: $1 \mu\text{L min}^{-1}$ (acceptor and sample).

2.5.4. Evaluation of analytical performance

The microfluidic LPME method was combined with liquid chromatography and evaluated for the determination of non-polar and polar basic model analytes (pharmaceuticals) at optimal experimental conditions as described above. A calibration curve was constructed using a least-square linear regression analysis at six different concentrations from 0.45 to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for ATN, MTP, and VRP and from 0.60 to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for TYR, NRP, and AMP, observing a linear relationship with r^2 values over 0.9995 in all cases. Table 4 summarizes the calibration parameters of the method: detection limits, quantitation limits and recoveries in standard solutions. Detection and quantitation limits were based on S/N ratio of 3 and 10, respectively. Method detection limits and quantitation limits were within 0.14 - 0.18 and 0.45 - $0.60 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, for all compounds. Extraction efficiencies were 90, 93, 100, 100, 99 and 84 % for TYR, ATN, MTP, VRP, NRP and AMP,

Results and discussion

respectively. Each experimental point was studied in triplicate, with relative standard deviation below 6 % for all analytes. The device and membrane reproducibility was tested using two different devices and different membranes, replacing the membrane three times in each device, obtaining a relative standard deviation between 4-8 % for all compounds. Repeatability and intraday repeatability were studied in triplicate at low, medium and high concentration levels of the calibration curve. A relative standard deviation between 4-6 % and 5-6% was obtained for repeatability and intraday repeatability, respectively.

2.5.5 Real samples analysis

Urine samples were collected from one 29-year-old healthy adult female volunteer. Each urine sample was spiked at one concentration level (0.75, 1 and 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) within the linear range, containing all analytes. All samples were spiked and pH adjusted (using NaOH) prior extraction. For 1:1 dilution factor, sample was diluted using MilliQ water. Non-diluted and 1:1 diluted samples were analysed keeping experimental parameters fixed at optimal conditions. All samples were submitted to the microfluidic device for extraction. Recoveries are shown in Table 10. As seen, high recoveries between 84-100 % were obtained at 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with no sample dilution. A 1:1 dilution did not show an increase in recovery, and therefore both samples can be considered for real sample analysis, in which the sample does not need to be diluted to obtain good recoveries. Slightly lower recoveries were observed in higher concentration spiked samples at 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (78-89%). Recoveries over 78 % were observed in all cases for all compounds. SLM stability was studied with the same and different membranes, observing good SLM stability for more than 10 consecutive extractions in both cases. The microfluidic method was successfully applied in urine samples as shown in Fig. 30A. Urine samples have been analysed without the proposed microfluidic procedure as shown in Fig. 30B. When both chromatograms are compared, the benefits of sample treatment procedures on complex urine samples can be clearly seen. The membrane acts selectively decreasing the interferences present in the real sample, resulting in an excellent clean-up.

Results and discussion

Table 10. Chromatogram of spiked human urine at $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ after submitted to the microfluidic device (A) and without (B). (1) TYR, (2) ATN, (3) MTP, (4) VRP, (5) NRP, (6) AMP.

Samples	Extraction efficiency \pm SD (%)					
	TYR	ATN	MTP	VRP	NRP	AMP
Urine $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ (non-diluted)	110 ± 5	92 ± 7	105 ± 6	89 ± 3	99 ± 7	84 ± 6
Urine $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1:1 dilution)	100 ± 7	92 ± 5	110 ± 3	90 ± 2	106 ± 3	89 ± 5
Urine $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (non-diluted)	100 ± 4	94 ± 3	97 ± 7	95 ± 4	99 ± 6	92 ± 3
Urine $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1:1 dilution)	102 ± 5	95 ± 6	101 ± 3	97 ± 7	102 ± 5	94 ± 4
Urine $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1:1 dilution)	80 ± 5	78 ± 2	89 ± 4	90 ± 7	79 ± 1	86 ± 6
Urine $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (non-diluted)	85 ± 7	80 ± 6	97 ± 5	96 ± 2	81 ± 2	92 ± 5

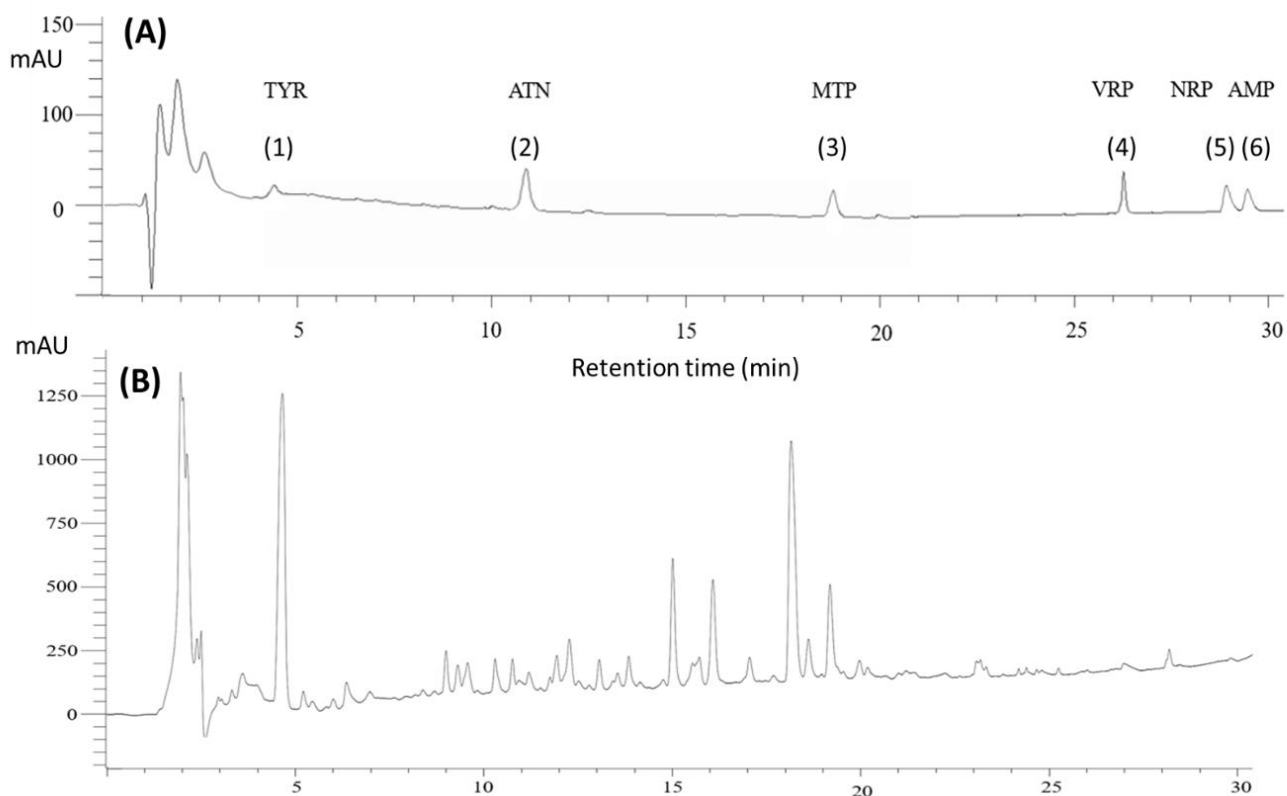


Fig. 30. Chromatogram of spiked human urine at $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ after submitted to the microfluidic device (A) and without (B). (1) TYR, (2) ATN, (3) MTP, (4) VRP, (5) NRP, (6) AMP.

Results and discussion

2.5.6. Conclusions

In this work, a microfluidic device for simultaneous liquid-phase microextraction of polar and non-polar basic pharmaceuticals is proposed for the first time. This device enabled exhaustive (or near-exhaustive) extraction of pharmaceuticals in the log P range 0.4 to 5 from 10 μL humane urine samples. With only 5 μL organic solvent as supported liquid membrane (SLM), at least 18 samples were extracted with the same SLM.

A comprehensive study of the supported liquid membraned (SLM) was carried out, and a SLM based on a 2:1 (v/v) mixture of tributyl phosphate (TBP) and dihexyl ether (DHE) was found to be an appropriate compromise SLM. Thus, excess of TBP kept the intrinsic hydrophobicity of the SLM relatively low, and this was mandatory for efficient extraction of the polar model analytes. DHE on the other hand reduced trapping of non-polar model analytes within the SLM, and enabled high recoveries for the model analytes with high log P. The compromise SLM thus provided efficient extraction of basic analytes over the entire log P range from 0.4 to 5. The TBP:DHE SLM was mechanically and chemically stable under dynamic conditions, was compatible with human urine samples, and provided highly efficient clean up.

Results and discussion

2.5.7. References

- [1] H. Cui, W. Gao, Y. Lin, J. Zhang, R. Yin, Z. Xiang, S. Zhang, S. Zhou, W. Chen, K. Cai, Development of microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of organic additives in biodegradable mulch films, *Microchem. J.* 160 (2021) 105722.
- [2] M.R. Afshar Mogaddam, M.A. Farajzadeh, M. Tuzen, A. Jouyban, J. Khandaghi, Organic solvent-free elevated temperature liquid–liquid extraction combined with a new switchable deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction of three phenolic antioxidants from oil samples, *Microchem. J.* 168 (2021) 106433.
- [3] I. Pacheco-Fernández, R. González-Martín, F.A. e Silva, M.G. Freire, V. Pino, Insights into coacervative and dispersive liquid-phase microextraction strategies with hydrophilic media – A review, *Anal. Chim. Acta.* 1143 (2021) 225–249.
- [4] B. Xu, M. Chen, J. Hou, X. Chen, X. Zhang, S. Cui, Calibration of pre-equilibrium HF-LPME and its application to the rapid determination of free analytes in biological fluids, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 980 (2015) 28–33.
- [5] C. Worawit, W. Alahmad, M. Miró, P. Varanusupakul, Combining graphite with hollow-fiber liquid-phase microextraction for improving the extraction efficiency of relatively polar organic compounds, *Talanta.* 215 (2020) 120902.
- [6] M. Abdel-Rehim, S. Pedersen-Bjergaard, A. Abdel-Rehim, R. Lucena, M.M. Moein, S. Cárdenas, M. Miró, Microextraction approaches for bioanalytical applications: An overview, *J. Chromatogr. A.* 1616 (2020) 460790.
- [7] G. Mafra, A.A. Vieira, J. Merib, J.L. Anderson, E. Carasek, Single drop microextraction in a 96-well plate format: A step toward automated and high-throughput analysis, *Anal. Chim. Acta.* 1063 (2019) 159–166.

Results and discussion

- [8] D.A.V. Medina, L.F. Rodríguez Cabal, G.M. Titato, F.M. Lanças, Á.J. Santos-Neto, Automated online coupling of robot-assisted single drop microextraction and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1595 (2019) 66–72.
- [9] M.M. Abolghasemi, M. Piryaei, R.M. Imani, Deep eutectic solvents as extraction phase in head-space single-drop microextraction for determination of pesticides in fruit juice and vegetable samples, *Microchem. J.* 158 (2020) 105041.
- [10] H. Bavlovič Piskáčková, P. Kollárová-Brázdová, R. Kučera, M. Macháček, S. Pedersen-Bjergaard, P. Štěrbová-Kovaříková, The electromembrane extraction of pharmaceutical compounds from animal tissues, *Anal. Chim. Acta.* 1177 (2021) 338742.
- [11] C. Huang, Z. Chen, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, X. Shen, Electromembrane extraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 95 (2017) 47–56.
- [12] M.L. Tan, M. Zhang, F. Li, F. Maya, M.C. Breadmore, A three-dimensional printed electromembrane extraction device for capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1595 (2019) 215–220.
- [13] M.A.P.A. Santiago, J.P. dos Anjos, M.M. Nascimento, G.O. da Rocha, J.B. de Andrade, A miniaturized simple binary solvent liquid phase microextraction (BS-LPME) procedure for pesticides multiresidues determination in red and rosè wines, *Microchem. J.* 167 (2021) 106306.
- [14] S. Bodur, E.G. Bakirdere, Simultaneous determination of selected herbicides in dam lake, river and well water samples by gas chromatography mass spectrometry after vortex assisted binary solvent liquid phase microextraction, *Microchem. J.* 145 (2019) 168–172.
- [15] M. Villar-Navarro, M. Ramos-Payán, J. Luis Pérez-Bernal, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, M. Ángel Bello-López, Application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the simultaneous HPLC determination of phenol substituting compounds (alkyl-, chloro- and nitrophenols), *Talanta.* 99 (2012) 55–61.
- [16] M. Mirzaei, H. Dinpanah, Three phases hollow fiber LPME combined with HPLC-UV for extraction, preconcentration and determination of valerenic acid in *Valeriana officinalis*, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1870–1874.

Results and discussion

- [17] D.S. Chormey, B.T. Zaman, N.A. Kasa, S. Bakirdere, Liquid phase microextraction strategies and their application in the determination of endocrine disruptive compounds in food samples, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 128 (2020).
- [18] M. Ramos Payán, M.Á.B. López, R. Fernández-Torres, M.V. Navarro, M.C. Mochón, Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) for a highly sensitive HPLC determination of sulfonamides and their main metabolites, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 197–204.
- [19] M.R. Payán, M.Á.B. López, R. Fernández-Torres, J.L.P. Bernal, M.C. 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.
- [20] S. Wu, R. Zhu, Y. Dong, C. Huang, X. Shen, Electromembrane extraction of barbiturates using tributyl phosphate as an efficient supported liquid membrane, *Anal. Chim. Acta.* 1129 (2020) 118–125.
- [21] 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.
- [22] M.R. Payán, M.Á.B. López, R.F. Torres, M.V. Navarro, M.C. Mochón, Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples, *Talanta.* 85 (2011) 394–399.
- [23] F.A. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of streptomycin from biological fluids, *J. Chromatogr. A.* 1639 (2021).
- [24] P. Berton, N.B. Lana, J.M. Ríos, J.F. García-Reyes, J.C. Altamirano, State of the art of environmentally friendly sample preparation approaches for determination of PBDEs and metabolites in environmental and biological samples: A critical review, *Anal. Chim. Acta.* 905 (2016) 24–41.
- [25] W. Alahmad, N. Tungkijanansin, T. Kaneta, P. Varanusupakul, A colorimetric paper-based analytical device coupled with hollow fiber membrane liquid phase microextraction (HF-

Results and discussion

- LPME) for highly sensitive detection of hexavalent chromium in water samples, *Talanta*. 190 (2018) 78–84.
- [26] M. Ramos Payán, M.Á. Bello López, R. Fernández-Torres, J.A.O. González, M. Callejón Mochón, Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 332–341.
- [27] A. Rahimi, S. Nojavan, M. Maghsoudi, Analysis of basic drugs in biological samples using dynamic single-interface hollow fiber liquid-phase microextraction combined with fast electromembrane extraction, *Microchem. J.* 157 (2020) 105001.
- [28] X. Yu, X. Li, S. You, Y. Shi, R. Zhu, Y. Dong, C. Huang, Electromembrane extraction of chlorprothixene, haloperidol and risperidone from whole blood and urine, *J. Chromatogr. A*. 1629 (2020) 461480.
- [29] F.A. Hansen, P. Kubáň, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction of highly polar bases from biological samples – Deeper insight into bis(2-ethylhexyl) phosphate as ionic carrier, *Anal. Chim. Acta*. 1115 (2020) 23–32.
- [30] M. Behpour, H. Tabani, S. Nojavan, Gel electromembrane extraction using rotating electrode: A new strategy for mass transfer enhancement of basic drugs from real human urine samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1152 (2020) 122258.
- [31] G.M. Ben-Hander, A. Makahleh, B. Saad, M.I. Saleh, K.W. Cheng, Sequential hollow-fiber liquid phase microextraction for the determination of rosiglitazone and metformin hydrochloride (anti-diabetic drugs) in biological fluids, *Talanta*. 131 (2015) 590–596.
- [32] C. Huang, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction with alkylated phosphites and phosphates as supported liquid membranes, *J. Memb. Sci.* 526 (2017) 18–24.
- [33] C. Huang, X. Shen, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard, Investigation of alternative supported liquid membranes in electromembrane extraction of basic drugs from human plasma, *J. Memb. Sci.* 548 (2018) 176–183.

Results and discussion

- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] C. Huang, K.F. Seip, A. Gjelstad, X. Shen, S. Pedersen-Bjergaard, Combination of Electromembrane Extraction and Liquid-Phase Microextraction in a Single Step: Simultaneous Group Separation of Acidic and Basic Drugs, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6951–6957.
- [37] F.A. Hansen, E. Santigosa-Murillo, M. Ramos-Payán, M. Muñoz, E. Leere Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction using deep eutectic solvents as the liquid membrane, *Anal. Chim. Acta.* 1143 (2021) 109–116.
- [38] M. Ramos-Payan, S. Maspoch, A. Llobera, A simple and fast Double-Flow microfluidic device based liquid-phase microextraction (DF- μ LPME) for the determination of parabens in water samples, *Talanta.* 165 (2017) 496–501.
- [39] M. Ramos-Payan, S. Maspoch, A. Llobera, An effective microfluidic based liquid-phase microextraction device (μ LPME) for extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological and environmental samples, *Anal. Chim. Acta.* 946 (2016) 56–63.
- [40] E. Santigosa, S. Maspoch, M. Ramos Payán, Liquid phase microextraction integrated into a microchip device for the extraction of fluoroquinolones from urine samples, *Microchem. J.* 145 (2019) 280–286.
- [41] M.R. Payán, E.S. Murillo, J. Coello, M.Á.B. López, A comprehensive study of a new versatile microchip device based liquid phase microextraction for stopped-flow and double-flow conditions, *J. Chromatogr. A.* 1556 (2018) 29–36.
- [42] C. Roman-Hidalgo, E. Santigosa-Murillo, M. Ramos-Payán, N.J. Petersen, J.P. Kutter, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electromembrane extraction of acidic drugs, *Electrophoresis.* 40 (2019) 2514–2521.

Results and discussion

- [43] N.J. Petersen, H. Jensen, S.H. Hansen, S.T. Foss, D. Snakenborg, S. Pedersen-Bjergaard, On-chip electro membrane extraction, *Microfluid. Nanofluidics*. 9 (2010) 881–888.
- [44] M.D. 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.
- [45] Y. Abdossalami Asl, Y. Yamini, S. Seidi, B. Ebrahimpour, A new effective on chip electromembrane extraction coupled with high performance liquid chromatography for enhancement of extraction efficiency, *Anal. Chim. Acta*. 898 (2015) 42–49.
- [46] M. Karami, Y. Yamini, Y. Abdossalami Asl, M. Rezazadeh, On-chip pulsed electromembrane extraction as a new concept for analysis of biological fluids in a small device, *J. Chromatogr. A*. 1527 (2017) 1–9.
- [47] F. Zarghampour, Y. Yamini, M. Baharfar, M. Faraji, Electromembrane extraction of biogenic amines in food samples by a microfluidic-chip system followed by dabsyl derivatization prior to high performance liquid chromatography analysis, *J. Chromatogr. A*. 1556 (2018) 21–28.
- [48] 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.
- [49] E. Santigosa-Murillo, S. Maspoch, M. Muñoz, M. Ramos-Payán, An efficient microfluidic device based on electromembrane extraction for the simultaneous extraction of acidic and basic drugs, *Anal. Chim. Acta*. 1160 (2021) 338448.
- [50] M. Schüller, K.T.T Tran, E. L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, Membrane-based liquid-phase microextraction of basic pharmaceuticals –A study on the optimal extraction window, *J. Chromatogr. A*. 1664 (2022) 462769.

3. Conclusiones/ Conclusions

Conclusiones/ Conclusions

Una vez considerados los resultados expuestos en esta memoria se puede concluir que los sistemas microfluídicos empleando membranas líquidas soportadas son sistemas reproducibles, rápidos y versátiles, para la separación y determinación de analitos de diferentes familia y naturaleza, bien de manera individual y/o simultáneamente, ofreciendo una excelente y satisfactoria aplicación en muestras biológicas.

En base a los estudios llevados a cabo en esta tesis, podemos concluir lo siguiente:

1. El diseño, fabricación y optimización de dispositivos microfluídicos sencillos se adaptan con éxito a la técnica LPME, acelerando la transferencia de masas de los analitos a través de la membrana. La optimización de los dos canales microfluídicos de dimensiones 23 x 03 x 0.13 mm, separados por la SLM, ha permitido desarrollar una plataforma versátil capaz de extraer una amplia rama de analitos, tantos ácidos como básicos de manera individual, en un rango de polaridad comprendido entre $-0.4 < \log P < 4.9$.
2. Los dispositivos microfluídicos simples que han sido diseñados, fabricados y optimizados para la implementación de la técnica de extracción por EME han demostrado ser una alternativa interesante para la extracción de parabenos, obteniendo recuperaciones cercanas al 100%. Estos dispositivos se han construido sobre dos placas de PMMA con canales de dimensiones similares a los empleados en la LPME, a diferencia de la incorporación de un hilo de platino que recorre el canal ejerciendo de electrodo, y cuyo diámetro determina, por tanto, la profundidad mínima de estos canales.
3. Las plataformas microfluídicas de PMMA permiten una gran variedad de geometrías haciendo posible incorporar aspectos más innovadores, retando de esta manera desafíos importantes en el campo de la química analítica, como es la extracción simultanea de compuestos de muy diversa índole, como el caso de analitos ácidos y analitos básicos. Además, generan un gran potencial ya que han permitido implementar simultáneamente una doble EME proporcionando un sistema estable, manteniendo las ventajas que la EME

Conclusiones/ Conclusions

tradicional presenta, como es su excelente clean-up, mejorando sus principales ventajas y erradicando sus inconvenientes. De esta manera, se consigue un solo sistema microfluidico de doble EME en un solo paso para la extracción simultánea de ácidos y bases de gran versatilidad disminuyendo el tiempo de extracción, el volumen de muestra y reactivos empleados.

4. El circuito eléctrico equivalente propuesto y la caracterización por EIS en un dispositivo sencillo de EME ha demostrado el gran potencial que tiene esta técnica en la mejora de futuras optimizaciones de sistemas de microextracción, al otorgar un profundo conocimiento de los sucesos de transporte y fenómenos químico-físicos que ocurren en el sistema. De esta manera, se propone un sistema en el que es posible predecir las condiciones óptimas mediante EIS con el objetivo de disminuir el tiempo de análisis. Este estudio se ha realizado para la optimización de parabenos mediante EME, resultando en altas eficiencias de extracción y una excelente clean up en muestras biológicas.
5. El diseño de nuevas SLM de origen natural de compuestos denominados eutécticos, junto al estudio de las interacciones ocurrentes en la interfase analito-SLM han permitido desarrollar sistemas de microextracción basados en el formato *96-well* completamente ecológicos, siendo la primera vez que estos disolventes eutécticos son aplicados en EME. Los resultados han demostrado que sistemas EME con SLMs basadas en mezclas de coumarin-thymol proporcionan rendimientos claramente superiores a estos mismos sistemas con solventes clásicos, como el NPOE para bases o el 1-octanol para ácidos, bajo las mismas condiciones óptimas de extracción.
6. Las plataformas microfluídicas integrando LPME han demostrado también una gran versatilidad para extraer simultáneamente compuestos de polaridad muy diferente, como es el caso de analitos ácidos polares y no polares. Además, estas plataformas basadas en

Conclusiones/ Conclusions

LPME permiten trabajar en condiciones amigables con el medioambiente, haciendo posible el uso de disolventes ecológicos (camphor: mentol 1:1) como SLM; y alcanzando rendimientos comparables a los de un sistema tradicional, sustituyendo los solventes tóxicos tradicionales por sistemas de microextracción completamente sostenibles. Este sistema se aplicó a muestras de orina bajo las condiciones óptimas de trabajo, obteniendo unas recuperaciones de 72-100%, quedando demostrada el gran rendimiento de este solvente biodegradable en la extracción de analitos de una amplia ventana de polaridad.

7. El estudio de nuevas combinaciones de solventes clásicos ha permitido mejorar la versatilidad de los sistemas microfluídicos basado en la LPME, logrando extraer satisfactoriamente analitos básicos de una amplia polaridad, de manera simultánea. El empleo de 2:1 (v/v) TBP:DHE como SLM ha hecho posible extraer por primera vez analitos básicos de polaridades comprendidas entre $-0.4 < P < 4.9$, superando eficiencias de extracción del 78% (RSD menores al 7%) en muestras de orina humana.
8. En resumen, en esta tesis se ha estudiado de manera exhaustiva el uso de un sistema microfluídico aplicado al campo de tratamiento de muestra, una etapa crítica previa al análisis. No solo se han diseñado nuevos sistemas que han permitido integrar diferentes técnicas de extracción en una sola etapa; sino que también se han optimizado los parámetros operacionales críticos para llevar a cabo las extracciones bajo condiciones óptimas, como es la selección de la membrana líquida soportada. Estos sistemas se han diseñado para LPME, EME y doble EME en una sola etapa. Además, han permitido extraer no solo compuestos de una sola familia como son los parabenos sino extraer simultáneamente compuestos ácidos polares y no polares, compuestos básicos polares y no polares; y compuestos ácidos y básicos simultáneamente. Por otro lado, el estudio de impedancia en estos sistemas ha abierto un gran abanico de posibilidades con el objetivo de reducir el número de experimentos durante la optimización, permitiendo predecir las eficiencias de extracción.

Conclusiones/ Conclusions

9. Finalmente, el estudio exhaustivo de la membrana líquida soportada ha permitido mejorar la versatilidad en los procedimientos de tratamiento de muestra, no solo miniaturizados, puesto que estas SLM son aplicables a otros sistemas recogidos en la literatura. Estas SLMs puras o como mezclas son una alternativa atractiva para ampliar el abanico de compuestos para llevar a cabo extracciones de manera simultánea. Entre estas SLM podemos destacar el uso de: 1-octanol, 1:1 NPOE:dodecanol, 2:1 TBP:DHE ; además de SLMs ecológicas como 2:1 coumarin-thymol y 1:1 camphor-menthol. Estos sistemas microfluídicos no solo son compatibles con el medioambiente reduciendo el volumen de disolventes tóxicos, sino que, mantienen el resto de ventajas que aportan estos sistemas miniaturizados como son el reducido coste de fabricación, su rentabilidad, su pequeño tamaño, el bajo consumo de volumen de muestra requerido, bajo consumo de disolventes, reducidos tiempos de extracción, la posibilidad de llevar a cabo extracciones consecutivas, el excelente clean-up en muestras reales, su posible acoplamiento con técnicas de análisis instrumental y los bajos potenciales necesarios (como es el caso de EME) compatibles con una simple batería.

Conclusiones/ Conclusions

Once the results presented in this thesis have been considered, it can be concluded that microfluidic systems based on supported liquid membranes are an attractive alternative with great potential in the field of sample treatment thanks to its high reproducibility, short extraction and its great versatility for the separation and determination of analytes of different families and nature, either individually and/or simultaneously, providing an excellent and successfully application in biological samples.

From the studies carried out in this thesis, we can conclude the following:

1. The design, fabrication and optimisation of single microfluidics devices can successfully implement a LPME technique, increasing the mass transfer of analytes across the membrane. The optimisation of the two 23 x 03 x 0.13 mm microfluidic channels, separated by the SLM, has allowed the development of a versatile platform that can extract a wide range of analytes, both acidic and basic individually, in a polarity range between $-0.4 < \log P < 4.9$.
2. Microfluidic devices can also implement EME extraction techniques and it has demonstrated to be an interesting alternative for the extraction of parabens, obtaining recoveries close to 100%. These devices have been fabricated on two PMMA plates with channels of similar dimensions to the devices used in LPME, except for the incorporation of a platinum wire that crosses the channel and works as an electrode. The diameter of this electrode determines the minimum depth of these channels.
3. PMMA microfluidic platforms allow a wide variety of geometries enabling the incorporation of more innovative aspects, overcoming important challenges in analytical chemistry, such as the simultaneous extraction of compounds of very diverse nature, as in the case of acidic and basic analytes. Moreover, these geometries generate a great potential because they have allowed the simultaneous implementation of a double EME providing a stable system, which keeps the advantages of traditional EME, such as its

Conclusiones/ Conclusions

excellent clean-up and improves its main advantages. In this way, a single microfluidic double EME system for the simultaneous extraction of acids and bases of great versatility in a single step is achieved, reducing the extraction time, the sample volume and the reagents used.

4. The proposed electrical equivalent circuit and characterisation by EIS on a simple EME device has demonstrated a great advance of this technique in the improvement of future optimisations of microextraction systems. EIS provides a deep understanding of the transport processes and chemical-physical phenomena in the system. In this way, a system is proposed in which it is possible to predict the optimal conditions by means of EIS with the aim of reducing the analysis time. This study has been carried out for the optimisation of parabens by EME, obtaining high extraction efficiencies and excellent clean up in biological samples.
5. The design of new SLMs of natural origin of compounds called eutectics, together with the study of the interactions occurring at the analyte-SLM interface, have allowed the development of microextraction systems based on the 96-well format, completely ecological, applying these solvents for the first time in EME. The results have shown that EME systems with SLMs based on coumarin-thymol mixtures achieve clearly higher throughputs than these same systems with classical solvents, such as NPOE for bases or 1-octanol for acids, under the same optimal extraction conditions.
6. Microfluidic platforms adapted to LPME have also demonstrated great versatility to simultaneously extract compounds of very different polarity, such as polar and non-polar acidic analytes. Moreover, these LPME platforms allow working under environmentally friendly conditions, enabling the use of environmentally friendly solvents (camphor: menthol 1:1) such as SLM; and achieving throughputs comparable to those of a traditional system. This makes it possible to replace traditional toxic solvents with fully sustainable microextraction systems. This system was applied to urine samples under optimal working

Conclusiones/ Conclusions

conditions, obtaining recoveries of 72-100% and showing the high performance of this biodegradable solvent in the extraction of analytes from a wide polarity window.

7. The study of new combinations of classical solvents has improved the versatility of LPME microfluidic systems, successfully extracting basic analytes of a wide polarity simultaneously. The use of 2:1 (v/v) TBP:DHE as SLM has made it possible for the first time to extract basic analytes of polarities between $-0.4 < P < 4.9$, exceeding extraction efficiencies of 78% (RSD less than 7%) in human urine samples.
8. In summary, this thesis has exhaustively studied the use of a microfluidic system applied to the field of sample treatment, a critical step prior to analysis. Not only new systems have been designed to integrate different extraction techniques in a single step, but also the critical operational parameters have been optimised to carry out the extractions under optimal conditions, such as the selection of the supported liquid membrane. These systems have been designed for LPME, EME and double EME in a single step. Moreover, they have made it possible to extract not only compounds from a single family, such as parabens, but also polar and non-polar acidic compounds, polar and non-polar basic compounds, and acidic and basic compounds simultaneously. On the other hand, the study of impedance in these systems has opened up a wide range of possibilities with the aim of reducing the number of experiments during optimisation, allowing extraction efficiencies to be predicted.
9. Finally, the exhaustive study of the supported liquid membrane has improved the versatility of sample treatment procedures, not only miniaturised, since these SLMs are applicable to other systems reported in the literature. These SLMs pure or as mixtures are an attractive alternative to expand the range of compounds to carry out simultaneous extractions. Among these SLMs we can highlight the use of: 1-octanol, 1:1 NPOE:dodecanol, 2:1 TBP:DHE; as well as environmentally friendly SLMs such as 2:1 coumarin-thymol and 1:1 camphor-menthol.

Conclusiones/ Conclusions

10. These microfluidic systems are not only compatible with the environment by reducing the volume of toxic solvents, but also maintaining the other advantages of these miniaturised systems such as reduced manufacturing cost, cost-effectiveness, small size, low sample volume consumption, low solvent consumption, shorter extraction times, the possibility of carrying out consecutive extractions and its coupling with instrumental analysis techniques, excellent clean-up on real samples and low potentials required (as in the case of EME) compatible with a simple battery.

Annex I

Attached below are the scientific papers completed in this thesis:

- E. Santigosa-Murillo, X. Muñoz-Berbel, S. Maspoch, M. Muñoz, M. Ramos-Payán, Impedance model for voltage optimization of parabens extraction in an electromembrane millifluidic device, *J. Chromatogr. A.* 1625 (2020) 461270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461270>.
- E. Santigosa-Murillo, S. Maspoch, M. Muñoz, M. Ramos-Payán, An efficient microfluidic device based on electromembrane extraction for the simultaneous extraction of acidic and basic drugs, *Anal. Chim. Acta.* 1160 (2021) 338448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338448>.
- F.A. Hansen, E. Santigosa-Murillo, M. Ramos-Payán, M. Muñoz, E. Leere Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, Electromembrane extraction using deep eutectic solvents as the liquid membrane, *Anal. Chim. Acta.* 1143 (2021) 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.044>.
- E. Santigosa, S. Pedersen-Bjergaard, M. Muñoz, M. Ramos-Payán, Green microfluidic liquid-phase microextraction of polar and non-polar acids from urine, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 3717–3723. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03320-9>.

A collaborative work with the research field of solar cell development is attached in this annex.

Metal Oxides in Stable and Flexible Halide Perovskite Solar Cells: Toward Self-Powered Internet of Things

Carlos Pereyra¹, Haibing Xie¹, Amir N. Shandy¹, Vanessa Martínez^{1,2}, Henck Pierre¹, Elia Santigosa^{1,3,4}, Daniel A. Acuña-Leal^{1,5}, Laia Capdevila¹, Quentin Billon¹, Löis Mergny¹, María Ramos-Payán⁴, Mónica Gomez², Bindu Krishnan⁵, Maria Muñoz³, David M. Tanenbaum^{1,6}, Anders Hagfeldt⁷, and Monica Lira-Cantu¹

¹Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology (ICN2), CSIC and the Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Building ICN2, Campus UAB E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

²Universidad Nacional de Ingeniería, Faculty of Science, Av. Túpac Amaru 210, Lima, Peru

³Universitat Autònoma de Barcelona, Department of Analytical Chemistry, Carrer Til·lers, 08193 Bellaterra, Spain

⁴University of Seville, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, c/Prof. García González s/n, 41012, Seville, Spain

⁵Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66455, México

⁶Department of Physics and Astronomy, Pomona College, Claremont, CA 91711, USA

⁷Laboratory of Photomolecular Science (LSPM), Institute of Chemical Sciences and Engineering, School of Basic Sciences, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

8.5 Characterization of PSC by Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)

In this section, we wanted to include recently published works where the EIS technique has been applied to characterize PSC applying metal oxides (Table 8.4). Among many other techniques, we believe this characterization method can contribute to understanding the stability of flexible PSCs, especially under constant irradiation conditions. However, in this section, we would like to review the different approaches found for applying electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The method can be described as a stationary technique measuring the current response when an AC voltage is applied in a frequency range. An important advantage of EIS over other techniques is using low amplitude voltages to obtain very low disturbances in the system.

Dong et al. use an ITO/ZnO/perovskite/spiro-OMeOTAD/Au solar cell with an initial 20% PCE [16]. An impedance study was performed for which measurements were made under dark conditions. Only one semicircle is observed under dark conditions, which corresponds to the resistance of the interface between HTL and the perovskite. It offered information about the charge transfer resistance and (R_{ct}) and/or resistance to recombination (R_{rec}). This is since charge transfer resistance and/or resistance to recombination of the interface between ETL and

Annex II

Table 8.4 Electrochemical impedance spectroscopy (EIS).

Device structure (the best)	Perovskite	Photovoltaics parameters (reverse)					Impedance parameters (in dark)			References
		V_{oc} (V)	J_{sc} (mA cm^{-2})	FF (%)	PCE (%)	VV	R_s (Ω)	R_{rec}/R_{tr} (Ω)	CPE (F)	
FTO/TiO ₂ -c/TiO ₂ -m/perovskite/ ZrO ₂ /Cu:NiO _x /C	MAPbI ₃	1	22.15	0.57	12.79	0.2		4000		[62]
ITO/SnO ₂ /perovskite/spiro- OMeTAD/Au	MAPbI ₃	1.06	23.14	0.75	18.34		46	215	5E-8	[143]
ITO/ZnO/perovskite/spiro- OMeTAD/Au	MA _{0.1} FA _{0.75} Cs _{0.15} PbI _{2.9} Br _{0.1}	1.13	23.49	77.00	20.44	1.1	23	1116		[16]
ITO/Cu:NiO _x /perovskite/ PCBM/Al	MAPbI ₃	1.11	23.60	70.00	18.30	1.0	22	425		[25]
FTO/S-NiO/perovskite/PCBM/ BCP/Ag	MAPbI ₃	0.99	22.92	80.30	18.15			5000		[26]

Device structure (the best)	Perovskite	Photovoltaics parameters (reverse)										References
		V_{oc} (V)	J_{sc} (mA cm^{-2})	FF (%)	PCE (%)	VV	R_s (Ω)	R_{tr} (Ω)	CPE1 (F)	R_{rec} (Ω)	CPE2 (F)	
FTO/TiO ₂ -c/TiO ₂ -m/perovskite/ ZrO ₂ /Cu:NiO _x /C	MAPbI ₃	1.00	22.2	0.57	12.8	0.2		22		24		[62]
FTO/TiO ₂ c/TiO ₂ m/perovskite/ P3HT:PCBM/Au	MAPbI ₃	0.98	19.1	0.7	13.1			474	1.6E-7	642	2.2E-5	[144]
FTO/SnO ₂ /perovskite/spiro- OMeTAD/Au	Cs5FAMA	1.10	22.7	0.77	19.4	1	18	70		110		[38]
FTO/TiO ₂ c/perovskite/PMMA/ spiro-OMeTAD/Ag	MAPbI ₃	1.0	21.86	0.78	17.15	-1		1200				[145]
ITO/PEDOT:PSS/perovskite/ PCBM/Ag	MAPbI ₃	0.98	19.2	0.73	14.2			500		3000		[146]
FTO/TiO ₂ c/m-Zn ₂ Ti ₃ O ₈ / perovskite/spiro-OMeTAD/Au	MAPbI ₃	1.02	22.0	0.78	17.2	0.7	2.5	92.8		486.7		[147]

(Continued)

Annex II

Table 8.4 (Continued)

Device structure (the best)	Perovskite	Photovoltaics parameters (reverse)										References
		V_{OC} (V)	J_{sc} (mA cm^{-2})	FF (%)	PCE (%)	VV	R_s (Ω)	R_{tr} (Ω)	CPE1 (F)	R_{rec} (Ω)	CPE2 (F)	
FTO/SnO ₂ /Cs-perovskite/WO ₃ /spiro-OMeTAD/Au	Cs-MAPbI ₂	1.17	23.70	0.77	21.44	1		4250				[148]
ITO/ZnO/perovskite/P(NDI2DT-TTCN)/Au	MAPbI ₃	1.00	22.0	0.77	17.0				25 000			[149]
FTO/dye-NiO _x (M)/perovskite/BSO/PCBM/Ag	MAPbI ₃	1.04	21.5	0.71	16.2	0.7	2.4	4794	9251			[150]
FTO/NB:TiO ₂ /perovskite/spiro-OMeOTAD/Au	MAPbI ₃	1.13	23.50	0.78	19.1		33	2.51E6				[151]
FTO/TiO ₂ c/TiO ₂ m/perovskite/spiro-OMeTAD/Au	MAPbI ₃	1.01	20.4	0.72	15.5	0.4	58.3	8541	2.87E4			[152]
FTO/ZnO/perovskite/P3TAA (42%)/Ag	MAPbI ₃	0.95	15.7	0.67	9.98	0	9.43	44.8	1E-6	788	49E-6	[153]
ITO/PVO/perovskite/PC ₇₁ BM/AG	MAPbI ₃	0.88	22.7	0.74	15.0	0.9	12.6	16.9	61E-9	60	17E-9	[154]
ITO/ZnO/perovskite/spiro-OMeOTAD/Au	MA _{0.1} FA _{0.75} Cs _{0.15} PbI _{2.9} Br _{0.1}	1.13	23.49	0.77	20.44	0.9	33	331		5361		[16]
FTO/S-NiO/perovskite/PCBM/BCP/Ag	MAPbI ₃	0.99	22.92	80.30	18.15			5000				[36]
FTO/Zw-SnO ₂ /perovskite/spiro-OMeTAD/Au	MAFACs BrPbI ₃	1.14	23.30	78.80	20.91		8.1	255				[14]
FTO/Cu:NiO _x /perovskite/PC ₆₁ BM/CeO _x /Ag	MAPbI ₃	1.06	21.52	76.07	17.35	0.8	23.92	650				[17]
FTO/c-TiO ₂ /Li:m-TiO ₂ /perovskite/spiro-OMeTAD/Au	MAFACsPbI ₃	1.14	23.30	69.78	18.20			525				[155]

Device structure (the best)	Perovskite	Photovoltaics parameters (reverse)					Impedance parameters (1 sun)					Refs.
		V_{OC} (V)	J_{sc} (mA cm^{-2})	FF (%)	PCE (%)	VV	R_s (Ω)	R_{tr} (Ω)	CPE1 (F)	R_{rec} (Ω)	CPE2 (F)	
a-FTO/bI-SnO ₂ /perovskite/spiro-OMeTAD/Au	MAPbI ₃	1.11	22.8	0.76	19.2		4.88	28				[156]
b-FTO/SnO ₂ /perovskite/spiro-OMeTAD/Au	MAPbI ₃	1.05	23.03	0.75	18.2			1200				[157]
b-FTO/SnO ₂ /perovskite/spiro-OMeTAD/Au	MAPbI ₃	1.05	23.03	0.75	18.2	0.6		800				[157]

PSC applying metal oxides which have been characterized by the impedance spectroscopy technique.

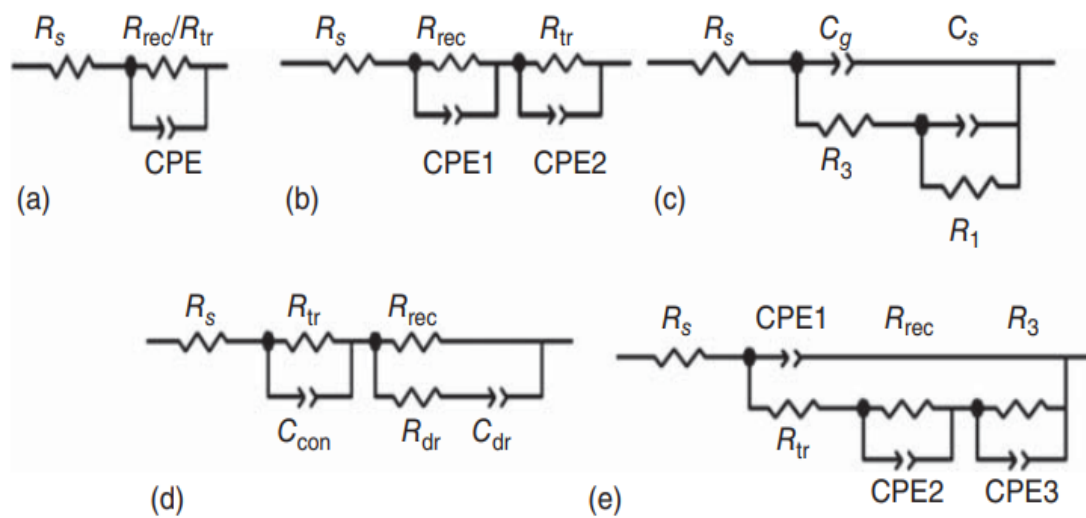


Figure 8.8 Application of the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) for the study of PSCs. Most applied equivalent circuits (a–e) employed for the characterization of PSCs.

the perovskite is small to be detected due to the rapid electron injection, large contact area, and better interface contact. [16, 25, 26, 62, 158] Kim et al. employed a-FTO/SnO₂/Cs-perovskite/WO₃/spiro-OMeTAD/Au solar cell with an initial 21.44% PCE. The series resistance of the high-frequency region is attributed to the wiring and FTO interface. In this study, the Nyquist plots' main arc corresponds to the recombination resistance and the chemical capacitance (CPE) of the ETLs/CH₃NH₃PbI₃/spiro-OMeTAD interfaces. A secondary semicircle appears at the low-frequency region, which is associated with the counter electrode interface [148]. In general, under the conditions of 1 Sun, a semicircle is the high-frequency region observed. This semicircle is attributed to the charge transfer resistance between the HTL/perovskite interface. A second semicircle appears in the region of low frequencies attributed to resistance to recombination. On the other hand, the capacitance of high frequency (CPE1) is generally attributed to the polarization capacity of perovskite and the bulk dielectric capacitance of the HTM. In contrast, the capacitance at low frequency (CPE2) is much related to the ion accumulation in the device interval and the slow movement of the charges (ions) inside the perovskite [14, 16, 17, 36, 38, 144–147, 149–155, 159, 160].

Another group directed by Ngo et al. and Pham et al. suggest another type of equivalent circuit (see Figure 8.8) to explain the different processes between a PSC interface. The authors determine a capacitive element (C_g) at high frequencies associated with the dielectric properties of the perovskites, and a resistive element (R_3) associated with the transport resistance of the electron of the perovskite interface. At low frequencies, we obtain the elements attributed to the properties of the perovskite, C_s , and R_1 . C_s refers to ionic or electronic accumulation capacitance at electrode interfaces under dark or illuminated conditions. Meanwhile, R_1 determinate to recombination resistance [161, 162]. Other authors such as Xiong et al. and Ulfa et al. suggest other equivalent circuits (Figure 8.8d,e) based on previous studies by Bisquert et al. and Guerrero et al., respectively. Both authors adapt the equivalent circuits depending on the interfaces of their devices, slightly with respect to the circuits discussed above [142, 156, 157, 160].