



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandia

Preparación de un sorbente polimérico específico para el
análisis de BPA

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencias Ambientales

AUTOR/A: Sánchez Akum, Esther Angono

Tutor/a: Torres Cartas, Sagrario

Cotutor/a: Meseguer Lloret, Susana

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Resumen

El BPA es un potencial disruptor endocrino debido a su capacidad de unirse a receptores de estrógenos. Este compuesto bifuncional se utiliza como monómero en la síntesis de los policarbonatos, por lo que su posible lixiviación desde los plásticos al medio ambiente debe ser controlada. De ahí, el interés de sintetizar nuevos sorbentes específicos para el análisis de dicho compuesto. En este proyecto se han desarrollado en el interior de un tubo ETFE columnas monolíticas permeables y uniformes, las cuales se han modificado con el aptámero del BPA. Se han empleado distintas mezclas de polimerización, distintos grosores de tubo, distintos métodos de polimerización y distintos tratamientos de adición del aptámero. Además, se ha estudiado la capacidad de separación del BPA en las distintas columnas desarrolladas al emplearlas como fase estacionaria en HPLC: se ha observado diferencias en la retención del BPA al emplear las columnas modificadas con aptámero respecto a las columnas sin modificar (columnas de referencia).

Palabras clave: BPA, HPLC, columnas monolíticas, aptámero.

Abstract

BPA is a potential endocrine disruptor due to its ability to bind to estrogenic receptors. This bifunctional compound is used as a monomer in the synthesis of polycarbonates, so its possible leaching from plastics into the environment must be controlled. Hence, the interest in synthesizing new specific sorbents for the analysis of said compound. In this project, permeable and uniform monolithic columns, which have been modified with the BPA aptamer, have been developed inside an ETFE tube. Different polymerization mixtures, tube thicknesses, polymerization methods, and aptamer addition procedures have been used. In addition, the BPA separation capacity of the developed columns has been studied by using them as a stationary phase in HPLC, and differences in BPA retention behaviour between the aptamer-modified columns and the reference ones have been observed

Palabras clave: BPA, HPLC, columnas monolíticas, aptámero.

Índice

1.	Introducción	1
1.1.	El bisfenol A	1
1.2.	Procedencia del BPA	1
1.2.1.	Policarbonatos	2
1.2.2.	Resinas epoxi	3
1.3.	Problemática ambiental y procesos de lixiviación	3
1.4.	Legislación BPA	5
1.5.	Análisis del BPA	5
1.6.	Cromatografía líquida de alta eficacia	8
1.7.	Componentes de un sistema de HPLC	9
1.8.	Columnas cromatográficas	11
1.8.1.	Columnas convencionales	11
1.8.2.	Columnas monolíticas	12
1.9.	Preparación de columnas monolíticas	13
1.9.1.	Componentes de la mezcla de polimerización	14
1.10.	Aptámeros	15
1.11.	Modificación de una columna monolítica con aptámero	16
2.	Objetivos	18
3.	Material, reactivos, aparatos e instrumentación	19
3.1.	Materiales y reactivos	19
3.2.	Aparatos e instrumentos de laboratorio	20
4.	Procedimiento experimental	21
4.1.	Preparación de las columnas monolíticas poliméricas sin aptámero	21
4.2.	Modificación de la pared interna del tubo ETFE	21
4.3.	Reacción de polimerización	23
4.4.	Funcionalización de las columnas con el aptámero tiolado del BPA.	28
4.4.1.	Preparación de la disolución de aptámero tiolado de BPA (Apt-SH)	28
4.4.2.	Funcionalización de la columna de MAA/EGDMA con el aptámero	29

4.4.3.	Funcionalización de la columna de GMA/DVB con el aptámero.....	31
4.5.	Estudio de la capacidad de separación del BPA mediante HPLC con las columnas desarrolladas.....	32
5.	Resultados y discusión	34
5.1.	Obtención de columnas monolíticas poliméricas en el tubo ETFE	34
5.1.1.	Resultados de la obtención de columnas monolíticas con luz láser azul.....	34
5.1.2.	Resultados de la obtención de columnas monolíticas empleando polimerización térmica	39
5.2.	Resultados de modificación de las columnas monolíticas con el aptámero.....	40
5.3.	Resultados de separación de BPA con las columnas modificadas con aptámero y sus columnas de referencia	44
5.3.1.	Análisis cromatográfico de BPA con las columnas de MAA/EGDMA/AIBN	44
5.3.2.	Análisis cromatográfico de BPA con las columnas de GMA/DVB/LPO.....	46
6.	Conclusiones	49
7.	Contribución de este TFG a los objetivos de desarrollo sostenible	50
8.	Bibliografía.....	51

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del BPA. Fuente: Wikipedia.....	1
Figura 2. Algunos productos fabricados con BPA. Fuente: ORBES: world news, science, technology, nutrition, finance.....	2
Figura 3. Reacción de síntesis del policarbonato.	2
Figura 4. Clasificación numérica de los tipos de plásticos. Fuente: Gestores de Residuos. ...	3
Figura 5. Tortuga alimentándose de una bolsa de plástico. Fuente: National geographic, 2022.	4
Figura 6. Componentes de un sistema HPLC. Fuente: ApuntesDe.	9
Figura 7. Ejemplo de un cromatograma. Fuente: Requena A. y col.....	10
Figura 8. Columnas comerciales para HPLC. Fuente: Sigma-Aldrich.....	11
Figura 9. Columna monolítica de GMA-DVB sintetizada en nuestro laboratorio (Soporte: tubo ETFE 0.75 mm d.i.).....	12
Figura 10. Estructuras moleculares de GMA, DVB, THF y 1-dodecanol.	15
Figura 11. Estructuras moleculares de MAA/EGDMA/ACN.	15
Figura 12. Estructura química del aptámero de BPA. Fuente: Figura modificada de Schiano M.E.	16
Figura 13. Esquema de la reacción de adición del aptámero para el polímero de GMA/DVB	17
Figura 14. Esquema de la reacción de adición del aptámero para el polímero de MAA/EGDMA	18
Figura 15. A: dos columnas conectadas secándose con nitrógeno; B: introducción de los reactivos mediante una bomba de jeringa.....	22
Figura 16. Columna rellena con disolución de ataque de la pared interna sobre el espejo (A) y en el interior de la cámara de UV (B).....	23
Figura 17. Puntero láser azul modificado para conectarlo a la corriente eléctrica.....	25
Figura 18. Montaje para la irradiación puntual de la columna.	26
Figura 19. Montaje para la irradiación de la columna con láser abierto.	26
Figura 20. Molde que contiene en su interior la columna de tubo ETFE rellena de polímero en la polimerización térmica.....	27
Figura 21. A. Centrífuga empleada en la preparación del aptámero. B. Termobloque en el que se realiza el plegamiento del APT-BPA.....	29
Figura 22. Bomba de jeringa en posición vertical para recoger la disolución a la salida de la columna en la reacción con el aptámero.	30
Figura 23. A. Montaje para pasar el VDMES en continuo a través de la columna monolítica polimérica de MAA/EGDMA. B. Esquema del montaje.....	30

Figura 24. A. Montaje para pasar la disolución de aptámero en continuo a través de la columna monolítica polimérica de MAA/EGDMA. B. Esquema del montaje.....	31
Figura 25. Esquema de adición de la disolución de Apt-SH a la columna de GMA/DVB.	32
Figura 26. Sistema de HPLC de la UPV. 1. Recipientes con la fase móvil. 2. Bomba de alta presión. 3. Inyector automático. 4. Detector de fluorescencia. 5. Columna.	33
Figura 27. A. Caja para la ubicación de la columna. B. Polimerización con luz láser puntual de la Columna 1.....	35
Figura 28. Columna 1 polimerizada mediante láser azul. En el círculo se señala la zona no polimerizada.....	35
Figura 29. Lavado en el sistema HPLC de la Columna 1. En el círculo, se observa la columna saliéndose.....	36
Figura 30. A: columna 2 tras la irradiación; B: columna 2 saliéndose.	36
Figura 31. Columna 5 tras la irradiación con láser.....	37
Figura 32. Montaje para la polimerización vertical (columna 7) con la columna abierta por el extremo superior.	38
Figura 33. Espectro UV-vis de la disolución de Apt-SH a tiempo 0 y a la salida de la columna al cabo de 5 horas de reacción.	41
Figura 34. Espectro UV-vis de la disolución de APT-BPA a la salida de la columna a tiempo 0 y a lo largo de 5 horas de reacción.	42
Figura 35. Espectro UV-vis de la disolución de APT-BPA a la salida de la columna a tiempo 0 y a las 3 horas de reacción en estático.	43
Figura 36. Espectro UV-vis de la disolución de APT-BPA a la salida de la columna a tiempo 0 y a las 5 horas de reacción en continuo.	43
Figura 37. Cromatogramas obtenidos en la determinación cromatográfica de BPA en modo gradiente con las columnas 12 y 14.	46
Figura 38. Cromatogramas obtenidos en la determinación cromatográfica de BPA con fase móvil 40%ACN:60%BB con las columnas 17 y 18.	47
Figura 39. Cromatogramas obtenidos en la determinación cromatográfica de BPA con fase móvil 30%ACN:70%BB con las columnas 19 y 20. Vinjección: 1 μ L de BPA 20 ppm.	48

Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplo de métodos de análisis desarrollados en los últimos 3 años para la determinación de BPA.	6
Tabla 2. Composición de la mezcla de polimerización con MAA/EGDMA usando Irgacure 819 como iniciador.....	24
Tabla 3. Composición de la mezcla de polimerización con MAA/EGDMA usando AIBN como iniciador.	24
Tabla 4. Composición de la mezcla de polimerización con GMA/DVB usando LPO como iniciador.	25
Tabla 5. Gradiente empleado en el ensayo de retención del BPA con fase móvil BB:ACN..	45
Tabla 6. Resultados de retención de BPA con las columnas de GMA/DVB y fase móvil ACN:Agua.....	47

1. Introducción

1.1. El bisfenol A

El bisfenol A (BPA) es una molécula orgánica que contiene dos grupos funcionales fenol, cuya estructura se muestra en la figura 1. Este compuesto es considerado un disruptor endocrino, ya que provoca interrupciones en la biosíntesis de las hormonas, en el metabolismo y en las acciones resultantes de estas, provocando una alteración en la homeostasia normal del individuo expuesto o en sus descendientes (Juan-García A. y col, 2015).

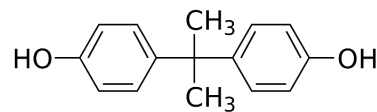


Figura 1. Estructura química del BPA. Fuente: Wikipedia.

Las vías de exposición humana al bisfenol A son diversas, ya que está presente en el aire, el suelo y el agua, siendo la exposición humana por vía oral, cutánea o inhalatoria, y sus efectos en la salud humana afectan a funciones como la reproducción, el desarrollo del cuerpo o el metabolismo, entre otros.

1.2. Procedencia del BPA

El BPA se utiliza en grandes cantidades a nivel mundial. En 2006 su producción se encontraba alrededor de los 3.8 millones de toneladas. (Juan-García A. y col, 2015). En 2016, la empresa estadounidense de estudios de mercado Expertos de la Industria cifró el consumo mundial de BPA durante 2015 en 7,2 millones de toneladas. La misma empresa proyectó que, para 2022, el consumo anual global sería de 10,6 millones de toneladas (ecverde).

El BPA se emplea principalmente en la fabricación de plásticos de policarbonato y de resinas epoxi. Por una parte, se ha hecho un uso extensivo del BPA en la fabricación de materiales plásticos de policarbonato que incluyen equipos electrónicos, recipientes reutilizables, platos, boles o utensilios de microondas, entre otros. Por otra parte, las resinas epoxi se han empleado habitualmente en pinturas epoxi, retardantes de llama, tintas de impresión, materiales dentales, discos compactos o digitales (CDs y DVDs) y como en la industria alimentaria para el recubrimiento de latas de alimentos y bebidas (Parto y col, 2022).



Figura 2. Algunos productos fabricados con BPA. Fuente: ORBES: world news, science, technology, nutrition, finance.

1.2.1. Policarbonatos

Dentro de la clasificación numérica de los plásticos (figura 4), los policarbonatos se encuentran en el grupo 7, *Otros*, que son plásticos muy complicados de reciclar y cuya composición en resinas no se sabe con certeza.

El policarbonato es un polímero termoplástico que tiene diversas propiedades entre las que se encuentran poseer una alta resistencia mecánica, baja absorción de la humedad y estabilidad térmica. Estas propiedades son ideales en el empleo de diversos trabajos como la fabricación de componentes de dispositivos móviles, consolas o automóviles; también se encuentran en envases de alimentación como latas de bebida (Galán Marrero, 2023).

Se necesita una polimerización entre monómero de bisfenol A y fosgeno en un medio básico para conseguir policarbonato. Otra de sus características del policarbonato es que es polar, es decir, los grupos carbonato que tiene en su estructura pueden hidrolizarse si se encuentra en un medio acuoso y a una temperatura elevada, des esta forma el polímero se degrada y se libera moléculas de BPA.

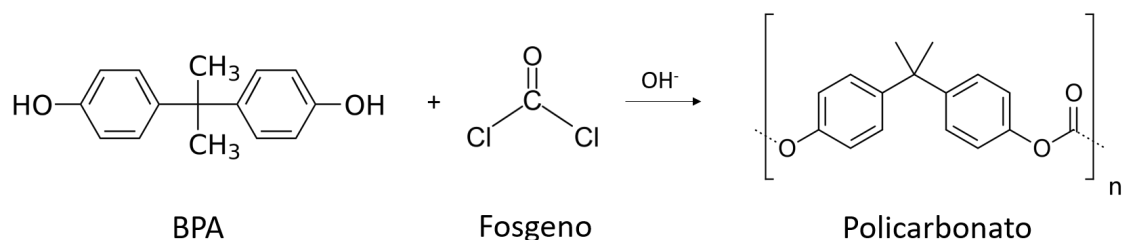


Figura 3. Reacción de síntesis del policarbonato.



Figura 4. Clasificación numérica de los tipos de plásticos. Fuente: Gestores de Residuos.

1.2.2. Resinas epoxi

Las resinas epoxi son un polímero termoestable que pasa de estado líquido a sólido cuando interacciona con un catalizador. Los componentes más habituales en estos polímeros son el bisfenol A y epiclorohidrina.

Algunas de sus características por las que son utilizadas en diferentes trabajos industriales son su dureza, su resistencia a altas temperaturas y se utilizan en la fabricación de fibras, revestimientos de superficie en diferentes áreas de trabajo como la industria textil, naval, artística entre otras muchas. (PLAREMESA).

1.3. Problemática ambiental y procesos de lixiviación

El uso indiscriminado de los plásticos ha hecho que en la actualidad se encuentren en cantidades incontroladas en el medio ambiente. La falta de concienciación en el reciclaje sumado a la dificultad de reciclaje de algunos de los plásticos, hace que estos residuos se encuentren en el medio ambiente (en el mar, ríos, bosques,...) y, en consecuencia, también en el ser humano. La fragmentación de los plásticos por diversos factores como los rayos del sol, las olas, o por el paso del tiempo, genera en el medioambiente la presencia de los microplásticos, pedazos con un tamaño inferior a los 5 mm, cuya retirada es complicada debido a su tamaño. Por otra parte, los plásticos y microplásticos pueden ser ingeridos por animales marinos, que llegan a confundirlos con sus presas, ocasionando su muerte por inanición debido a que se sacian con los plásticos (figura 5). Se han encontrado por ejemplo residuos microplásticos en bivalvos como la especie *Mytilus edulis*, este suceso es alarmante

ya que los plásticos pueden llegar a los distintos niveles de la cadena trófica incluido el ser humano (Sarria-Villa. y Gallo-Corredor, 2019).



Figura 5. Tortuga alimentándose de una bolsa de plástico. Fuente: National geographic, 2022.

Además de la problemática que produce la presencia de plásticos en las distintas especies del medio ambiente, hay que resaltar que la degradación de los plásticos produce ciertos componentes tóxicos que son liberados y adsorbidos tanto por la fauna como por la flora marina. Algunas sustancias preocupantes son metales pesados, bifenilos policlorados (PCB), hidrocarburos poliaromáticos (PAH), plaguicidas como el DDT, y el BPA procedente de materiales plásticos de policarbonato y resinas epoxi.

Este proceso de liberación de componentes tóxicos desde los plásticos se denomina lixiviación, y está favorecido por la acción del sol, las olas o la acción de microorganismos (Sarria-Villa R.A. y Gallo-Corredor J.A., 2019). Su preocupación radica en que estas toxinas son cancerígenas, mutagénicas y pueden llegar a bioacumularse a lo largo de la cadena trófica (Sbarbati Nudelman, 2020).

La migración del BPA hacia los alimentos en los procesos de lixiviación supone un problema para la salud humana debido a los problemas de salud que puede generar. La concentración que se ha encontrado en diversos alimentos es distinta ya que por lo visto presenta mejor solubilidad en ciertos alimentos como el pescado, debido a la liposolubilidad (Torres Sánchez y col, 2018).

1.4. Legislación BPA

El BPA se autorizó mediante el Reglamento de la Unión Europea 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Si bien esta directiva establecía la cantidad máxima permitida de BPA en alimentos que no tengan un riesgo para la salud en 0.01 mg/Kg (Reglamento 10/2011, 2011).

Posteriormente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), ha evaluado la toxicidad y posibles efectos en la salud humana de este compuesto en diversos estudios que se han ido recopilando desde el año 2013. En la actualidad la Comisión Técnica de Expertos de la EFSA ha reducido la ingesta diaria tolerable (IDT) del bisfenol A, el cual es 0.2 de nanogramos /kg peso corporal * día (EFSA, 2023).

Y el Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) publicó la cantidad de BPA máxima permitida establecida por el Reglamento (UE) nº 10/2011, el cual ha prohibido el uso de BPA en biberones y otros materiales como alimentos infantiles entre otros productos ya que el BPA migraba a hacia los recubrimientos de los productos (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2021).

1.5. Análisis del BPA

Dado el interés en la determinación de BPA, entre los años 2014-2021 se han publicado más de 40000 artículos científicos en los que se describe la determinación de BPA en muestras acuosas como aguas residuales, agua de río, agua para beber o bebidas enlatadas. En la mayoría de los casos el método analítico usado para la determinación fue cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a un detector de masas, fluorescencia o ultravioleta (Dos Santos Costa y col, 2022)

Como ejemplo se han seleccionado ejemplos de métodos desarrollados en los últimos 3 años para la determinación de BPA en diferentes matrices: matrices acuosas medioambientales, agua embotellada, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, leche, miel y envases de carne. En todos estos casos el método de análisis incluye una etapa de extracción previa al análisis (SPE, QuEChERS, extracción asistida por microondas) para la limpieza y preconcentración de los compuestos, y se ha empleado la como técnica de análisis la HPLC con diferentes detectores (masas, fluorescencia o DAD). En la tabla 1 se muestran algunas de las características de los procedimientos empleados en los artículos consultados.

Como se observa en la tabla, los distintos métodos de análisis desarrollados recientemente han permitido detectar la presencia de BPA, en concentraciones del orden $\mu\text{g/L}$ o ng/L , en distintos recipientes como botellas de PET y latas de aluminio con distintas muestras como agua, bebidas alcohólicas, en leche, miel, así como en muestras medioambientales de agua de diferente procedencia.

Tabla 1. Ejemplo de métodos de análisis desarrollados en los últimos 3 años para la determinación de BPA.

Compuestos analizados	Matriz de análisis	Método de extracción	Método de análisis	[BPA] en las muestras	Referencia
BPA, BPB, BPF y DES	Bebidas alcohólicas y no alcohólicas en botellas de PET, PVC o latas de aluminio	MISPE	HPLC-DAD	[0.01-0.03] $\mu\text{g/L}$ en bebidas alcohólicas en botellas de PET con tapón de aluminio [0.012-0.041] $\mu\text{g/L}$ en latas de refrescos, bebida energética y cerveza 0.011 $\mu\text{g/L}$ en tetrapack de té verde.	Tsalbouris A. y col (2021)
BPA, BPB, BPC, BPE, BPF, BPG y derivados del BADGE,	Latas de bebidas energéticas, agua mineral y bebidas alcohólicas	<ul style="list-style-type: none"> De la capa interna de las latas: extracción sólido-líquido. De la bebida: Extracción líquido-líquido 	HPLC-FL	<ul style="list-style-type: none"> 0.003 mg/dm^2 en 4/10 latas. < LOD en todos los casos en las bebidas 	Lestido-Cardama, A. y col (2021)
BPA	Agua embotellada en PET	Sin pretratamiento	HPLC-UV-Vis	<ul style="list-style-type: none"> 0.09 mg/L en 17/24 muestras a los 50 días de su producción 0.19 mg/L en 22/24 muestras a los 300 días de su producción 	Parto M. y col (2021)
BPA	Agua embotellada en PET	SPE	HPLC-DAD	<ul style="list-style-type: none"> A T_{ambiente}: 9.46 ng/L Expuestas al sol 30 días (40 $^{\circ}\text{C}$): 16.1 ng/L En baño a 100$^{\circ}\text{C}$, 30 min: 14.7 ng/L 	Baz L. y col, (2023)

Compuestos analizados	Matriz de análisis	Método de extracción	Método de análisis	[BPA] en las muestras	Referencia
BPA	61 envases de plástico, metal o papel plastificado usualmente en contacto con alimentos: botellas de bebé, taza de cerámica, PET etc.	Extracción sólido-líquido con una disolución acuosa que simula un alimento: 1h/100°C; 2h/70°C; 24 h/40°C y 10 días/40°C.	HPLC-FL	< LOQ (0.005 mg/Kg) en todos los casos	Krivohlavek A. y col (2023)
BPA, 4-NP y 4-t-OP	Muestras de agua río en su desembocadura	SPE	HPLC-FL	(7.6-89.1) ng/L	Nehring I. y col (2023)
BPA, BPAP, BPF, BPS y BPZ	Muestras de miel	Micro-QuEChERS	UHPLC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> Miel Argelia: (4.64-10.2) µg/L en 4/15 muestras Miel Túnez: (9.00 - 16.5) µg/L en 2/10 muestras 	Potorti A.G. y col (2023)
BPA, BADGE, DBP y DOP	Envases de salchichas y jamón cocido	Extracción asistida con microondas	HPLC-DAD	3.20 µg/kg	Ceballos-Luna V. y col (2022)
BPA, BPBP, BPC, BPF, BPFL, BPG, BPM, PBS, and BPZ y derivados de BADGE	Leche de fórmula para bebés de 0 a 36 meses	Extracción asistida con ultrasonidos	LC-MS/MS	(0.68-12.5) µg/L	Kubica P. y col (2023)
BPA, BPE, BPF, y derivados de BADGE	Leche materna	DLLME	HPLC-FL	<LOQ (4.7 µg/L) en 2/10 muestras ~ LOD (1.5 µg/L) en 3/10	Szubartowski S. y Tuzimski T. (2023)

4-NP: 4-nonylphenol; 4-t-OP: 4-tert-octylphenol; BADGE: bisfenol A diglicidil eter; BPA: bisfenol A; BPAP: bisfenol AP; BPB: bisfenol B; BPBP: bisfenol BP; BPC: bisfenol C; BPE: bisfenol E; BPF: bisfenol F; BPFL: bisfenol FL; BPG: bisfenol G; BPM: bisfenol M; BPS: bisfenol S; BPZ: bisfenol Z; DES: Dietilestilbestrol; DBP: di-butyl-ftalato; DLLME: microextracción dispersiva líquido-líquido; DOP: di-octil-ftalato; HPLC-DAD : cromatografía líquida de alta resolución con detector diode; HPLC-FL: cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia; HPLC-UV-vis: cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-visible; LC-MS/MS: cromatografía líquida con detector masas-masas; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; MISPE: extracción en fase sólida con polímeros de impronta molécula; PET: polietileno tereftalato; SPE: extracción en fase sólida. UHPLC-MS/MS: Ultra cromatografía líquida de alta resolución con detector masas-masas.

1.6. Cromatografía líquida de alta eficacia

La cromatografía líquida de alta eficacia (en inglés, High Performance Liquid Chromatography, HPLC) es un método de análisis que permite separar los componentes de una mezcla permitiendo su detección y cuantificación de forma individual. Para permitir la separación, en la cromatografía se requiere el empleo de dos fases:

- La fase móvil, que es un líquido (disolvente o mezcla de disolventes) que circula por el sistema de manera constante durante todo el análisis.
- La fase estacionaria, que puede ser un sólido u otro líquido adherido a un sólido, que se encuentra fijo en el interior de una columna.

Para realizar el análisis de una mezcla de componentes, se hace pasar la fase móvil por la fase estacionaria sin interrupciones con la ayuda de una bomba de alta presión. La mezcla que se quiere analizar se inyecta en el sistema cromatográfico, y se hace pasar una vez inyectada en la fase móvil a través de la fase estacionaria. Así, los componentes de la mezcla se separan gracias a las interacciones específicas entre los distintos componentes de la mezcla con las fases móvil y estacionaria.

Según el tipo de fase móvil (líquido o gas), la cromatografía puede ser líquida o de gases. Y según el mecanismo de separación de los componentes de la mezcla (tipo de interacciones entre los componentes y las fases móvil y estacionaria), la cromatografía puede ser de varios tipos: de adsorción, de reparto, de exclusión molecular o de intercambio iónico.

En la cromatografía líquida de adsorción, que es la que se va aplicar en este TFG, la fase móvil es un líquido (disolvente o mezcla de disolventes) y la fase estacionaria es un sólido confinado o retenido en una columna. En este caso, la separación de los componentes de la mezcla dependerá de los equilibrios de adsorción-desorción entre los distintos componentes y las fases móvil y estacionaria. Las fuerzas de adsorción-desorción dependen principalmente de la polaridad de cada una de las fases y del componente a separar, así como de la actividad del sorbente empleado en la fase estacionaria (Museo Nacional de Ciencias Naturales).

1.7. Componentes de un sistema de HPLC

Un sistema de HPLC está compuesto por las siguientes partes:

1. Recipientes con uno o varios disolventes que constituyen la fase móvil.
2. Bomba de alta presión, para hacer circular la fase móvil por todo el sistema y atravesar la fase estacionaria.
3. Sistema de inyección o inyector, que introduce un pequeño volumen de la muestra a analizar en el sistema cromatográfico. El sistema de inyección puede ser manual o automático.
4. Columna cromatográfica: en su interior está confinada la fase estacionaria, y allí ocurren las interacciones de ambas fases con los distintos componentes de la muestra a analizar.
5. Detector, que proporciona una señal a lo largo del tiempo de análisis. El sistema de detección ha de ser el adecuado para proporcionar un aumento de la señal cuando pasa por ella cada uno de los componentes de la muestra.
6. Sistema de recogida de datos (ordenador con software adecuado), que permite registrar y guardar la señal que procede del detector a lo largo del tiempo de análisis, que se denomina cromatograma.

En la figura 6 se muestra un esquema de un sistema cromatográfico en la que se pueden observar los distintos componentes descritos anteriormente.

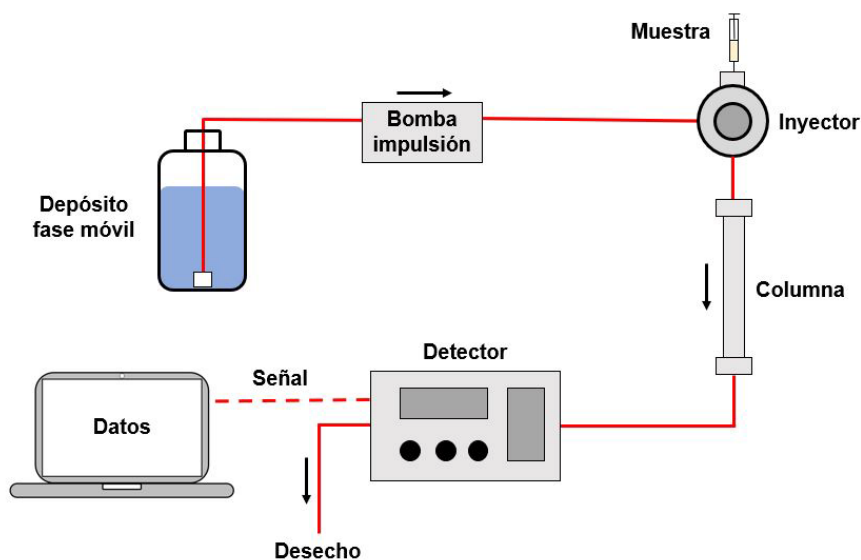


Figura 6. Componentes de un sistema HPLC. Fuente: ApuntesDe.

Como se ha comentado, el sistema de recogida de datos (ordenador) registra la señal del detector a lo largo del tiempo de análisis de manera continua. Este registro de la

señal en el tiempo se denomina cromatograma (figura 7). En el cromatograma, mientras no llega ningún componente al detector, la señal que se registra corresponde a la línea base. Por otra parte, se llama tiempo muerto (t_m) al tiempo que pasa desde que se inyecta la muestra hasta que llegan al detector los componentes de la mezcla que no se retienen en la fase estacionaria. Y el tiempo de retención (t_r) es el tiempo que pasa desde que se inyecta la muestra hasta que cualquiera de los componentes que se quiere determinar llega al detector. Como se observa en la figura 7, cuando el compuesto llega al detector se observa un aumento de la señal que baja tras haber pasado dicho componente, generándose en el cromatograma un pico cromatográfico, del cual se medirá el área de pico para su cuantificación. En el cromatograma de la figura únicamente aparece un pico que correspondería a uno de los componentes de la mezcla. En el análisis cromatográfico de una mezcla, los componentes de la mezcla llegan al detector en tiempos de retención diferentes, generándose un pico cromatográfico separado para cada uno de los componentes.

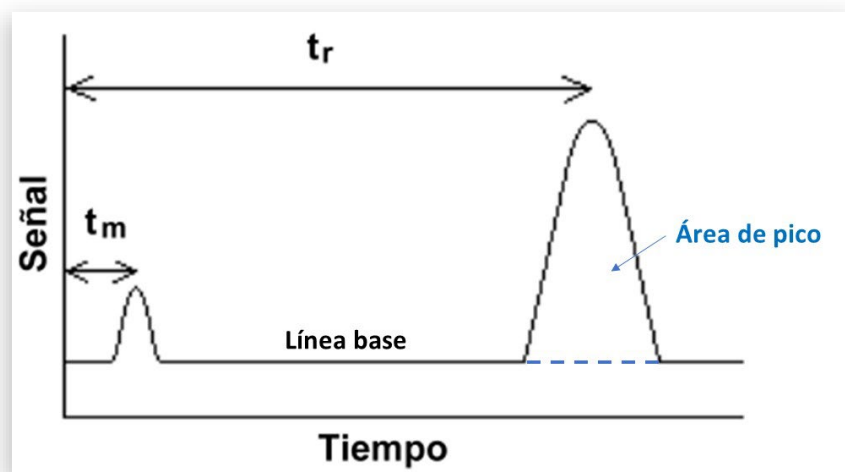


Figura 7. Ejemplo de un cromatograma. Fuente: Requena A. y col

Según el sistema de detección empleado, la señal que se registra en el cromatograma es diferente. Por ejemplo, un detector de fluorescencia mide la intensidad de emisión de fluorescencia, y un detector de UV-vis mide la absorbancia. El sistema cromatográfico puede registrar varias señales de manera simultánea si posee varios detectores haciendo pasar el flujo a la salida de la columna por cada uno de los detectores; con cada uno de los detectores empleados se obtendría un cromatograma.

1.8. Columnas cromatográficas

Existen varios tipos de columnas cromatográficas, entre las más utilizadas se encuentran las empaquetadas (comerciales) o también llamadas convencionales, y las monolíticas. Tradicionalmente, en los métodos de HPLC se hace uso de columnas comerciales, mayoritariamente constituidas por partículas compactadas.

1.8.1. Columnas convencionales

Las columnas convencionales se preparan en soportes de vidrio, acero inoxidable, cobre o aluminio, y normalmente están compuestas de esqueletos de sílice, donde las partículas son muy porosas facilitando que la fase móvil pase sin mucha resistencia.

Estas columnas (figura 8) pretenden satisfacer las demandas actuales de separación rápida mediante HPLC o ultra-HPLC y separación de biopolímeros u otros métodos de interés en farmacología y otros sectores (Sigma-Aldrich). En la web de Merck (www.merckmillipore.com), se destacan por ejemplo columnas basadas en partículas de carbón poroso grafitizado, partículas de sílice superficialmente porosas, partículas de sílice monolítica, partículas poliméricas porosas, y columnas para separaciones quirales, entre otras. Estas columnas presentan alto rendimiento y estabilidad, alta capacidad de retención y selectividad, y alta reproducibilidad y robustez. Sin embargo, en la mayoría de los casos, su precio es muy elevado, un gran inconveniente en laboratorios modestos.



Figura 8. Columnas comerciales para HPLC. Fuente: Sigma-Aldrich

1.8.2. Columnas monolíticas

En los últimos años, se han desarrollado **columnas monolíticas** sintetizadas en el laboratorio (figura 9), que son mucho más económicas y con muy buenas prestaciones para HPLC convencional (Catalá-Iardo. 2017; Catalá-Iardo, 2018; Ten Doménech, 2018; Torres Cartas. 2021). La fase estacionaria en este tipo de columnas, habitualmente un material poroso y continuo por donde los analitos podrán pasar a través de los poros e interactuar con la misma, se sintetiza dentro de un tubo.

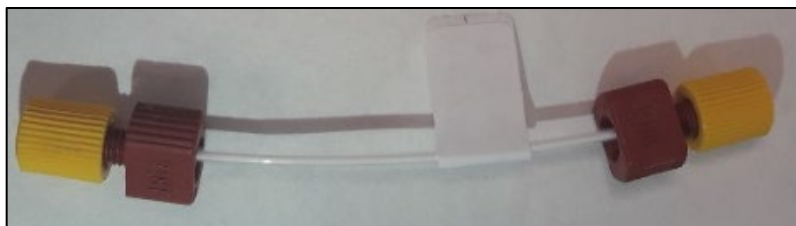


Figura 9. Columna monolítica de GMA-DVB sintetizada en nuestro laboratorio (Soporte: tubo ETFE 0.75 mm d.i.)

Las columnas monolíticas se fabrican normalmente en el interior de un capilar de sílice, aunque también se han desarrollado columnas empaquetadas en otros materiales como los tubos de acero inoxidable o el tubo PEEK, todos ellos con diámetros internos muy pequeños ($d.i. < 0.5 \text{ mm}$). Dado su bajo d.i., los tubos de sílice son los más habituales cuando se trabaja con electrocromatografía (CEC) y nano-HPLC. Para HPLC convencional, este tipo de tubos no tiene el diámetro interno necesario para que el flujo para trabajar sea el adecuado. Por ello, recientemente se están empleando otros materiales como el politetrafluoroetileno (PTFE) o etileno tetrafluoroetileno (ETFE) como soporte para las mismas, tubos con d.i. de 0.75 o 1.5 mm. Estos materiales, son polímeros termoplásticos resistentes a los ácidos, bases y disolventes, y además presentan buenas propiedades mecánicas.

En función del tipo de análisis a realizar y, tras el ataque de la pared interna del tubo empleado como soporte, se lleva a cabo la polimerización empleando una mezcla de polimerización adecuada a los compuestos que se pretendan analizar procurando el perfecto anclaje del polímero al soporte.

Una de las ventajas principales de la utilización de columnas monolíticas es que su síntesis es barata, tienen mucha estabilidad y baja resistencia al flujo, por lo que pueden sustituir a los materiales de relleno convencionales. Cabe destacar que la fabricación de las columnas monolíticas es realmente fácil por lo que ha cogido un gran auge en su empleo en comparación con las columnas de HPLC. Es cierto que este tipo de columnas tiene una superficie específica menor en comparación con las

columnas convencionales, pero para evitar este inconveniente se están utilizando otros compuestos como las nanopartículas para mejorar este aspecto. Otra de las grandes ventajas de estas columnas monolíticas es que el polímero se puede modificar para hacer las columnas más selectivas, de forma que permitan la retención de un determinado compuesto o compuestos con características químicas similares.

1.9. Preparación de columnas monolíticas

Como se ha comentado, existen muchos tipos de soporte y la mezcla de polimerización dependerá de los compuestos a analizar. Por ello, en este apartado se comentarán de forma general los pasos para la preparación de columnas monolíticas poliméricas empleando polímeros de metacrilato en soporte de tubo PTFE o ETFE que son las condiciones empleadas en las columnas preparadas en este TFG.

La preparación de las columnas monolíticas requiere 2 pasos:

1. **Ataque de la pared interna del material o tubo empleado como soporte**, para asegurar el correcto anclaje del polímero a la pared del soporte. En materiales como el PTFE o el ETFE, se puede realizar el ataque de la pared interna mediante 2 procedimientos distintos:
 - Con benzofenona (BZF) y etilendimetacrilato (EGDMA) en presencia de luz UV. Con este método se crean dobles enlaces en la pared interna del tubo, de modo que el polímero de metacrilato puede anclarse a la pared del tubo durante la polimerización.
 - Con ácido sulfúrico (H_2SO_4) y agua oxigenada (H_2O_2) (1:1) en un horno a una temperatura de $60^\circ C$. Con este ataque se generan grupos radicales ($\cdot OH$) en la pared interna del tubo de PTFE o ETFE, que facilitarán la unión del polímero al soporte.
2. **Reacción de polimerización**, en la que se genera el polímero dentro del soporte. Los componentes para realizar la polimerización constan de un monómero, un agente entrecruzante, uno o varios porógenos y un iniciador radicalario. En la reacción, el iniciador genera radicales libres que reaccionarán con el monómero generando el polímero. La unión entre las cadenas de polímero se lleva a cabo gracias a la presencia del agente entrecruzante. La presencia de los agentes porogénicos permiten que el polímero generado sea suficientemente poroso. Cuando finaliza la

polimerización se consigue un polímero poroso y un líquido inerte que se encuentra entre los poros. Este líquido y los residuos de reactivos sin reaccionar se eliminan en la limpieza de la columna.

1.9.1. Componentes de la mezcla de polimerización

A continuación, se detallan los componentes más habituales de la mezcla de polimerización empleados para preparar los polímeros de metacrilato.

- **Monómeros.** Los monómeros son moléculas orgánicas simples las cuales forman la unidad mínima de los polímeros. Estas moléculas se pueden unir entre ellas o con otros monómeros mediante enlaces covalentes formando así polímeros. Los monómeros más utilizados cuando se preparan columnas poliméricas de metacrilato son el ácido metacrílico (MAA) o los ésteres de metacrilato como el metacrilato de laurilo (LMA), metacrilato de estearilo (HMA), butilmetacrilato (BMA) y glicidilmetacrilato (GMA).
- **Entrecruzante.** El agente entrecruzante es un monómero bifuncional que une cadenas de monómero para formar redes poliméricas. Para este proyecto, los entrecruzantes que se han utilizado son el divinilbenceno (DVB) y dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA).
- **Porógeno.** El porógeno es un disolvente orgánico que disuelve el monómero y el entrecruzante proporcionando una mezcla de polimerización homogénea para que se forme el polímero. La cantidad y el tipo de porógeno define el tamaño de los poros del polímero, lo que influye en la presión con lo que se trabajará. Si los poros son de un tamaño pequeño influye en que la presión será mayor ya que el polímero pone resistencia de la fase móvil. Los porógenos más empleados son acetonitrilo (ACN), tetrahidrofurano (THF), 1-decanol y 1-dodecanol.
- **Iniciador.** Este componente es una sustancia que permite iniciar la reacción de la polimerización. Para que se inicie la polimerización, además de la presencia del iniciador en la mezcla, se requiere el uso de luz ultravioleta, luz láser o el aumento de temperatura. Para este proyecto se han preparado polímeros empleando la luz láser e iniciación térmica, y agentes iniciadores como el AIBN (azobisisobutironitrilo), el LPO (lauril peróxido) y el Irgacure 819 (Fenil bis (2,4,6-trimetilbenzoi) fosfina óxido).

En este trabajo se han preparado dos tipos de polímeros, uno con GMA/DVB/1-dodecanol/THF (figura 10) y otro con MAA/EGDMA/ACN (figura 11).

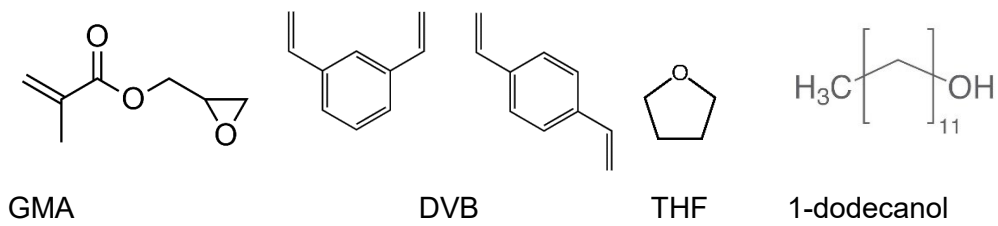


Figura 10. Estructuras moleculares de GMA, DVB, THF y 1-dodecanol.

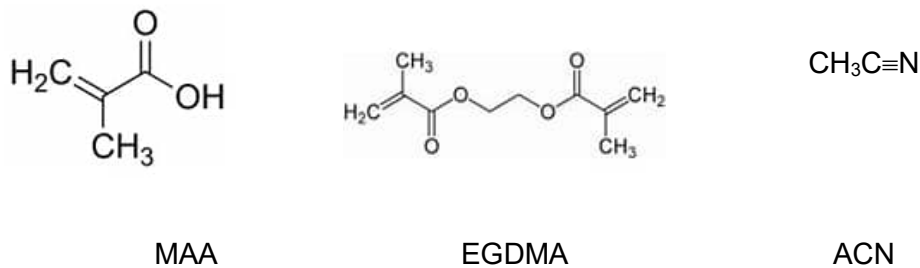


Figura 11. Estructuras moleculares de MAA/EGDMA/ACN.

Como ya se ha dicho, tras la polimerización, el polímero confinado en el soporte se puede funcionalizar para hacer el sorbente más selectivo. En este proyecto, las columnas poliméricas desarrolladas se han intentado funcionalizar con el aptámero del BPA.

1.10. Aptámeros

Un aptámero es un anticuerpo sintético que consiste en un fragmento de cadena de ADN o ARN con una longitud pequeña, normalmente su longitud oscila entre los 20-60 nucleótidos. Cada aptámero se diseña mediante un proceso combinatorio que parte de un banco de secuencias llamado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Torres Cartas, 2023), de forma que su estructura plegada es idónea para captar una molécula diana concreta.

Los aptámeros son utilizados debido a la gran afinidad y especificidad hacia los compuestos diana para los que han sido diseñados. Estos compuestos suelen ser biomoléculas como péptidos o proteínas, pero también pueden ser pequeñas moléculas de interés en análisis como el BPA (Schiano, 2022).

Algunas de las características que resultan atractivas para trabajar con este tipo de moléculas son su gran estabilidad y la posibilidad de poderse modificar químicamente con gran facilidad. Otra de sus características a tener en cuenta es que los aptámeros se pueden utilizar en cualquier matriz, para analizar una sustancia específica, debido a su fácil adición en medios acuosos.

Según Schiano (Schiano, 2022), para el análisis de BPA mediante biosensores se han empleado 6 aptámeros estructuralmente distintos, siendo el BPA-Apt-2 el más empleado en los trabajos científicos revisados. Dicho aptámero (figura 12), en su forma tiolada, es decir, unido a un -SH, es el que se ha empleado en este TFG para modificar las columnas monolíticas y estudiar la posible separación selectiva del BPA.

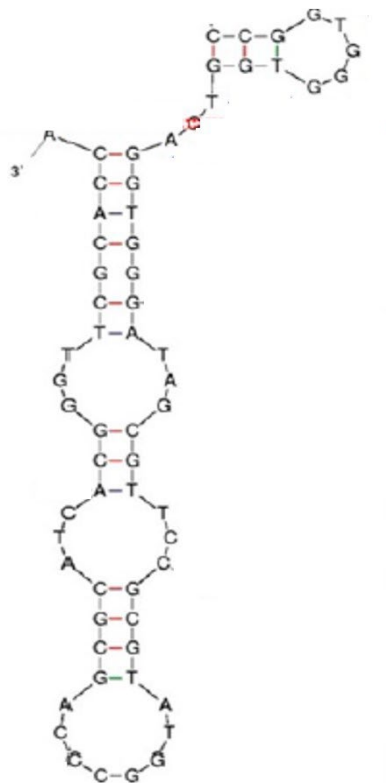


Figura 12. Estructura química del aptámero de BPA. Fuente: figura modificada de Schiano M.E.

1.11. Modificación de una columna monolítica con aptámero

Como ya se ha dicho, las columnas monolíticas se pueden funcionalizar tras la polimerización con el objetivo de mejorar las características del sorbente. Por ejemplo, si se añaden nanopartículas, se consigue obtener una mayor área superficial, lo que permite mayores interacciones con los analitos a estudiar, o también se consiguen

interacciones específicas con analitos concretos dependiendo del tipo de nanopartícula empleada.

En este proyecto, las columnas monolíticas poliméricas desarrolladas se han intentado funcionalizar con el aptámero del BPA con el objetivo de obtener una columna cromatográfica selectiva para la determinación de BPA.

Se ha de tener en cuenta que, en la etapa de funcionalización de las columnas, es importante el grupo funcional que queda disponible en el polímero para hacerlo reaccionar con el grupo funcional de la molécula que se desea unir a la columna:

- Cuando el polímero se sintetiza con la mezcla GMA/DVB, el grupo funcional disponible es el grupo “epoxi”. Este grupo, puede hacerse reaccionar directamente con el aptámero de BPA en su forma tiolada mediante una reacción click “tiol-epoxi” (Stuparu, M.C. y Khan A. 2016) según el esquema de reacción de la figura 13:

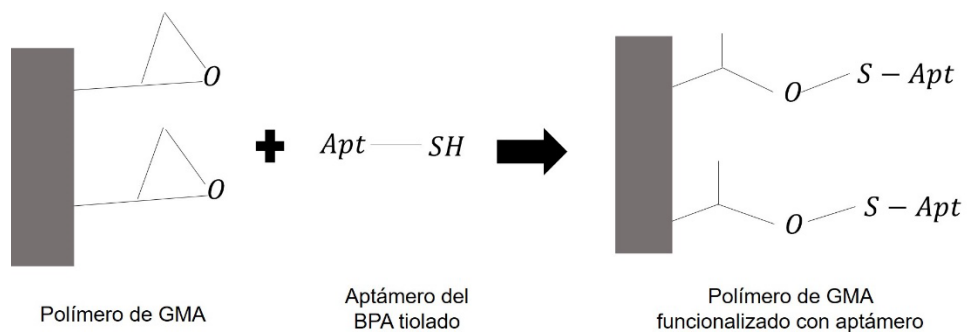


Figura 13. Esquema de la reacción de adición del aptámero para el polímero de GMA/DVB

- Cuando el polímero se sintetiza con la mezcla MAA/EGDMA, el grupo funcional disponible es el grupo “alcohol”. Este grupo, no puede hacerse reaccionar directamente con el aptámero de BPA, y tendrá que realizarse la adición en 2 etapas (esquema de reacción 2) (Schmidt M.E.P. y Botoli J., 2019): en la primera etapa, el grupo alcohol presente en el polímero se hace reaccionar con un reactivo vinilizante (VDMES, vinildimetiletoxi silano), de forma que se quedan en la estructura del polímero grupos vinilo (dobles enlaces). En la segunda etapa de reacción, los dobles enlaces se hacen reaccionar con el aptámero de BPA en su forma tiolada mediante una reacción click (tipo “tiol-eno”) de forma que el aptámero finalmente queda unido a la estructura del polímero.

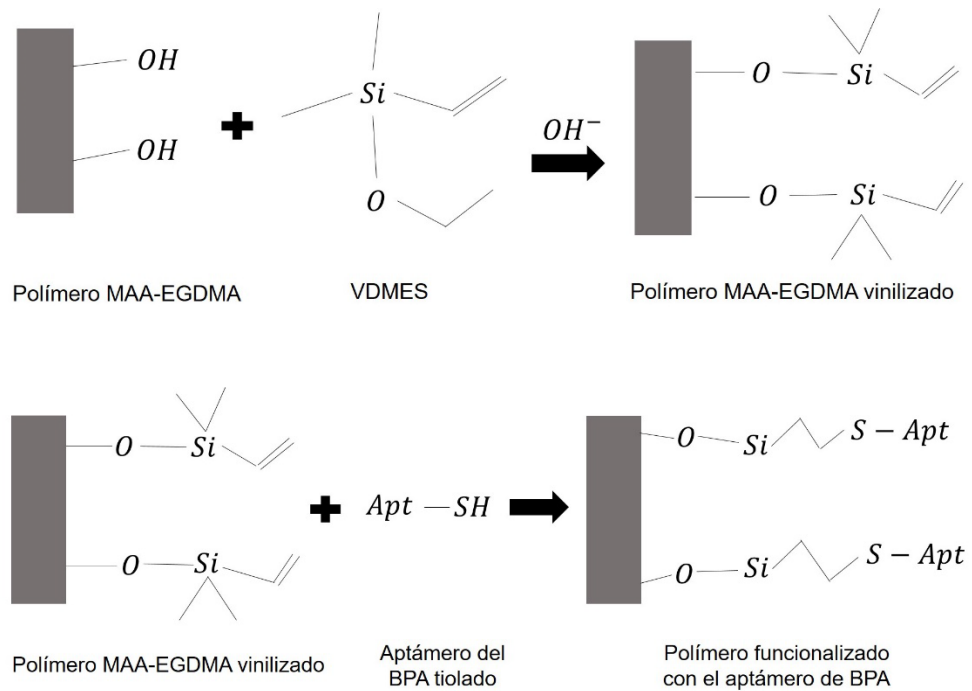


Figura 14. Esquema de la reacción de adición del aptámero para el polímero de MAA/EGDMA

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es estudiar la posibilidad de sintetizar una columna cromatográfica selectiva para la determinación de BPA.

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- Seleccionar la mezcla adecuada para obtener un polímero que sirva como sorbente para su uso como columna cromatográfica en un sistema de HPLC.
- Estudiar del método de polimerización más adecuado para la obtención del polímero que proporcione los mejores resultados en la determinación de BPA.
- Optimizar el proceso de modificación de la columna, mediante la adición de un aptámero, para mejorar la retención selectiva del bisfenol A en la col
- Comparar los resultados de retención obtenidos con la columna con y sin aptámero (columna de referencia).

3. Material, reactivos, aparatos e instrumentación

3.1. Materiales y reactivos

A continuación, se detallan todos los materiales específicos y reactivos químicos utilizados en el desarrollo del proyecto:

- 1-Decanol
- Acetona
- Acetonitrilo (ACN)
- Ácido metacrílico (MAA)
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
- Aptámero del BPA tiolado
- Azobisisobutironitrilo (AIBN)
- Benzofenona (BZF)
- Bisfenol A (BPA)
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$)
- Cloruro potásico (KCl)
- Cloruro sódico (NaCl)
- Cloruro de tetraetilamonio (TEACl)
- Dimetracrilato de etilenglicol (EGDMA)
- Dimetilsuóxido (DVB)
- Etanol
- Glicidil metacrilato (GMA)
- Irgacure 819
- Lauril peróxido (LPO)
- Metanol (MeOH)
- N_2 (gas)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Tetrahidrofurano (THF)
- Trietilamina (TEA)
- Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP)
- Tris (hidroximetil) aminometano (Tris)
- Tubos ETFE con un diámetro interno de 0.8 y 1.5 mm.
- Tubos de polipropileno (PP)
- Viniltrimetiletoxi silano (VDMES)

Disoluciones utilizadas:

- Disolución 91.59 μM de aptámero de BPA tiolado en Tris 10 mM y agua libre de DNA.
- Disolución de BZF al 5% preparada en MeOH, desgasificado pasando N_2 durante 10 min.
- Disolución de EGDMA al 15% preparada en MeOH, desgasificado pasando N_2 durante 10 min.
- Disolución de $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$ 1:1
- Disolución madre de BPA de 50 ppm en BB: 25 mM Tris, 100mM NaCl, 25mM KCl, 10mM MgCl_2 a pH8
- Disoluciones patrón de BPA entre 1,2.5,7.5,10 ppm en BB a partir de la disolución madre de BPA de 50ppm en BB
- Disolución de TCEP 275 mM en agua libre de DNA.
- Tampón de enlazado (*en inglés*, binding buffer, BB): 25 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl_2
- Tris 180 mM a pH 7.4 en agua libre de DNA

Cuando no se especifica otro disolvente, se ha usado agua Milli-Q para preparar las disoluciones.

3.2. Aparatos e instrumentos de laboratorio

A continuación, se detallan los aparatos de laboratorio e instrumentos de análisis que se han utilizado en el laboratorio para la realización de este trabajo:

- Agitador magnético
- Agitador vórtex
- Balanza analítica y granatario
- Banco óptico
- Baño de ultrasonidos
- Bomba de jeringa
- Bomba peristáltica
- Cámara UV con lámparas de 254 nm
- Centrífuga para tubos Eppendorf
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia
- Estufas y termobloque para tubos Eppendorf
- Microondas
- pH-metro

4. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental de desarrollo y testeo de las distintas columnas obtenidas en el laboratorio se describe en 3 partes:

- Preparación de las distintas columnas monolíticas en diversas condiciones sin aptámero
- Funcionalización de las columnas con el aptámero tiolado del BPA. Previo a esta etapa, debe prepararse una disolución del aptámero comercial.
- Estudio de la capacidad de separación del BPA mediante HPLC empleando las columnas desarrolladas.

4.1. Preparación de las columnas monolíticas poliméricas sin aptámero

La preparación de las columnas monolíticas poliméricas implica varias etapas:

1. Modificación de la pared interna del tubo ETFE, para generar puntos de anclaje para el polímero
2. Reacción de polimerización, en la que se genera el polímero que debe quedar anclado en el interior del tubo

4.2. Modificación de la pared interna del tubo ETFE

Es necesario modificar la pared interna del tubo ETFE para generar puntos reactivos en los que, posteriormente, el polímero pueda quedar anclado en su superficie.

El proceso comienza cortando unos 15 cm del tubo ETFE, si bien la columna cromatográfica final tendrá un tamaño menor (unos 10 cm) porque se han de cortar los extremos que no presentarán puntos de anclaje.

El interior de este tubo se lava, para evitar interferencias, en primer lugar con etanol (EtOH) y en segundo lugar con acetona. Finalmente, se seca haciendo pasar nitrógeno durante unos diez minutos para asegurarnos de que el interior del tubo esté completamente seco (figura 15-A).

La modificación de la pared interna se puede hacer mediante dos procedimientos distintos: con BZF/EGDMA o con H_2O_2 /GMA, si bien en este proyecto se ha empleado mayoritariamente el tratamiento con BZF/EGDMA.

El tratamiento con BZF/EGDMA consiste en 2 etapas:

- La primera etapa se realiza con una disolución de benzofenona al 5% preparada en MeOH: 1.5 mL de esta disolución que se hacen pasar por el tubo ETFE empleando una bomba de jeringa a un flujo de 6 ml/min (figura 15-B) y, el tubo lleno del reactivo y libre de burbujas finalmente se cierra con unos tapones. Para que la modificación con la BZF tenga lugar, el tubo se introduce en la cámara UV y se irradia durante 30 minutos empleando una longitud de onda de $\lambda=254$ nm. En este proceso, para evitar que los tapones de la columna absorban parte de la radiación UV, se envuelven con papel de aluminio. La columna se sitúa sobre un espejo que favorece la reflexión de la luz; la distancia de la columna con las lámparas es de unos 2.5 cm (figura 11). En esta etapa, quedan en la pared interna del tubo radicales que reaccionarán con el EGDMA en la segunda etapa.
- La segunda etapa del tratamiento se realiza empleando una disolución al 15% de EGDMA preparada en MeOH. La introducción de este reactivo en el tubo se realiza también con la bomba de jeringa (figura 16-A) y, el tubo lleno con el reactivo, se irradia durante 30 min en la cámara UV (figura 16-B). En esta etapa, se consigue que queden en la pared interna del tubo dobles enlaces que reaccionarán con los monómeros de metacrilado y el entrecruzante en el proceso de polimerización permitiendo el anclaje del polímero al tubo. Tras esta segunda etapa de tratamiento, se vuelve a lavar la columna con MeOH y se seca el tubo con N₂. Se han de cortar los 2 extremos de la columna (unos 2 cm de cada parte) ya que en los extremos no ha habido ataque. La columna limpia y seca se mantiene cerrada en el desecador hasta su utilización en la etapa de polimerización.

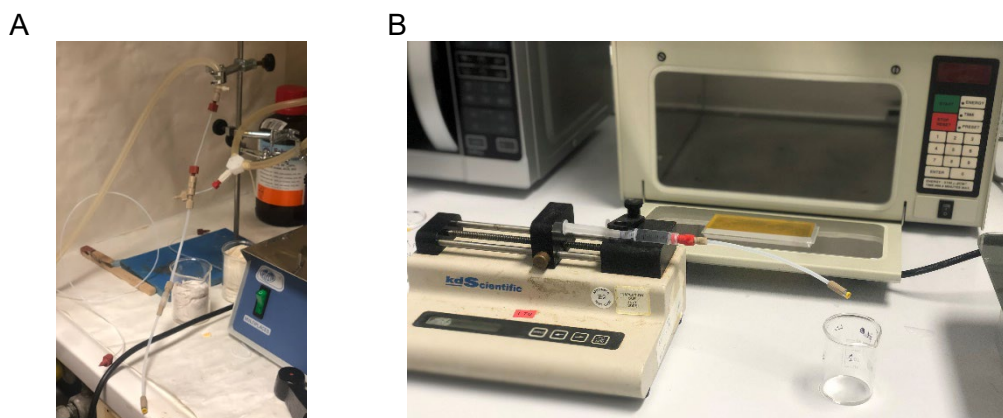


Figura 15. A: dos columnas conectadas secándose con nitrógeno; B: introducción de los reactivos mediante una bomba de jeringa.

A



B



Figura 16. Columna rellena con disolución de ataque de la pared interna sobre el espejo (A) y en el interior de la cámara de UV (B).

Por otra parte, el **tratamiento con H₂O₂/GMA** consiste también en 2 etapas:

- En la primera etapa se emplea una disolución de H₂O₂:H₂SO₄ (1:1), que se introduce con la bomba de jeringa en el tubo limpio y seco, y se deja el tubo tapado con la disolución en su interior en una estufa a 70°C durante 1h. Con esta etapa se consigue tener grupos reactivos en la pared interna del tubo que reaccionarán en la segunda etapa con el GMA.
- En la segunda etapa, se introduce en la columna una disolución 2 M de GMA y 5 mM de TEA a pH 8 preparada en acetona. El tubo se rellena con esta segunda disolución, se cierra y se introduce en el microondas durante 5 minutos a máxima potencia. Como en el caso anterior, con esta etapa se consigue tener dobles enlaces en la pared interna del tubo que posteriormente se unirán al monómero y entrecruzante en la etapa de polimerización y facilitarán el correcto anclaje del polímero al tubo soporte. Una vez acabado el proceso de modificación de la pared interna, se procede a la limpieza del tubo con MeOH y su posterior secado con N₂. El tubo limpio y seco se mantiene en el desecador hasta su utilización como soporte en la etapa de polimerización. Con este tratamiento, no hace falta cortar los extremos ya que el ataque se produce en todo el tubo.

4.3. Reacción de polimerización

Una vez se dispone de un tubo ETFE con la pared adecuadamente modificada, se procede a la polimerización para obtener la columna monolítica en su interior.

Para llevar a cabo el proceso de polimerización, en general, en primer lugar se prepara en un vial una mezcla de monómero, entrecruzante, porógeno o porógenos, e iniciador, que se ha de agitar en US 3 minutos y desoxigenarse con N₂ unos 10 minutos. Esta mezcla se introduce en el interior del tubo ETFE limpio y se procede a la polimerización térmica o con láser.

A continuación, se dan más detalles acerca de las distintas mezclas y procesos de polimerización empleados.

En este trabajo, se han preparado columnas monolíticas de GMA/DVB y de MAA/EGDMA partiendo de **mezclas** ya conocidas y empleadas por el grupo de investigación en otros trabajos (Beltrán Martí, 2019; Domingo Martí, 2018; Muñoz-Bartual y col, 2023).

La composición de las principales mezclas empleadas se detalla a continuación en las tablas 2-4. Empleando la mezcla MAA/EGDMA e Irgacure 819 como iniciador, además de la mezcla de la tabla 2, se han preparado otras mezclas con una relación monómero-entrecruzante (%MAA-%EGDMA) 30:70 y 40: 60. Empleando la mezcla MAA/EGDMA con iniciación térmica con AIBN se ha preparado únicamente una mezcla con la composición de la tabla 3. Empleando la mezcla GMA/DVB (tabla 4) la polimerización se ha realizado únicamente mediante iniciación térmica con LPO.

Tabla 2. Composición de la mezcla de polimerización con MAA/EGDMA usando Irgacure 819 como iniciador.

Reactivo	mmoles	Masa o Volumen
MAA	0.67	0.0579 g
EGDMA	3.48	0.6900 g
ACN		5.0 mL
Irgacure 819		0.0075 g

Tabla 3. Composición de la mezcla de polimerización con MAA/EGDMA usando AIBN como iniciador.

Reactivo	mmoles	Masa o Volumen
MAA	0.80	0.0688 g
EGDMA	4.00	0.7929 g
ACN		6.0 mL
AIBN		0.0066 g

Tabla 4. Composición de la mezcla de polimerización con GMA/DVB usando LPO como iniciador.

Reactivo	mmoles	Masa o Volumen
GMA	4.69	0.6667 g
DVB	7.68	1.0000 g
THF		0.3000 g
1-dodecanol		3.0333 g
LPO		0.0500 g

En cuanto a los **procesos de polimerización**, se han empleado 2 procesos distintos, polimerización con luz láser azul (en distintas condiciones) y polimerización térmica en estufa. Como se ha comentado, en función del proceso de polimerización, el iniciador empleado fue distinto.

Para realizar la *polimerización con luz láser* se emplea un puntero láser azul comercial que se ha modificado para poder conectar a la corriente eléctrica y así conseguir una luz de potencia estable (figura 17).



Figura 17. Puntero láser azul modificado para conectarlo a la corriente eléctrica.

Tras introducir la mezcla de polimerización en el tubo con ayuda de una bomba de jeringa, se cierra la columna con los tapones, se sitúa en el soporte seleccionado, y se aplica la radiación con el láser. También en alguno de los ensayos, la irradiación con láser se ha realizado con la columna abierta por uno de los extremos.

Con el láser, se han empleado 2 modos de irradiación:

- Irradiación puntual (figura 18), en la que se deja fijo el láser a lo largo de la columna cada cierto tramo (0.5-2cm) durante un tiempo (5-10 minutos) situando la columna en una caja envuelta en papel de aluminio.



Figura 18. Montaje para la irradiación puntual de la columna.

- Irradiación con el láser abierto (figura 19), mediante un montaje que requiere un banco óptico. En dicho montaje, la luz láser se abre situando una lente tras el punto de luz, y se irradia toda la columna a la vez durante un tiempo determinado.



Figura 19. Montaje para la irradiación de la columna con láser abierto.

Para realizar la *polimerización térmica*, el tubo ETFE tratado se introduce en otro tubo de polipropileno (PP) y se hace pasar la mezcla de polimerización por el interior y el exterior del tubo ETFE con ayuda de una jeringa. El tubo de PP sirve de contenedor tanto del tubo ETFE relleno con la mezcla de polimerización como del exceso de mezcla. Este tubo contenedor se tapa por arriba con blue-tac y se pone en posición vertical en un vaso de precipitados (figura 20), el cual se introduce en la estufa el tiempo necesario y a la temperatura adecuada para cada mezcla. Así, la polimerización térmica requiere 24h a 60°C cuando se usa la mezcla MAA/EGDMA, y 4h a 70°C para obtener una columna monolítica polimérica de GMA/DVB. Tras la polimerización, el tubo ETFE relleno con el polímero se saca del interior del molde y se desecha todo el polímero que hay por fuera. Tras la limpieza, se le han de poner unas uniones a cada extremo que permitan su utilización en el sistema cromatográfico.

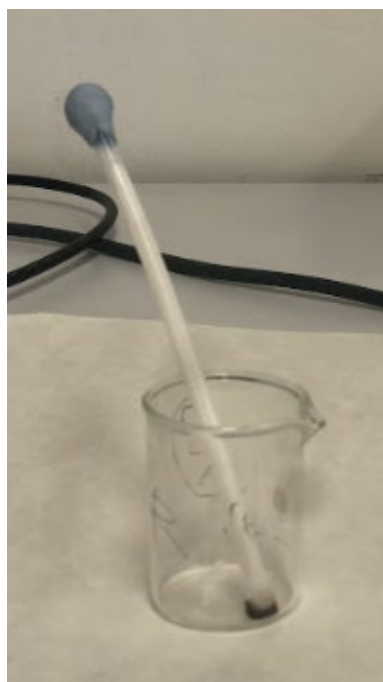


Figura 20. Molde que contiene en su interior la columna de tubo ETFE rellena de polímero en la polimerización térmica.

Tanto tras el proceso de polimerización con láser como tras el proceso de polimerización térmica, las columnas obtenidas se han de lavar para eliminar los restos de la mezcla de polimerización. Para ello, se conecta la columna sintetizada al sistema de HPLC y se lava la columna de metanol. Inicialmente se hace pasar el metanol a flujo muy bajo para evitar que la columna se rompa y, poco a poco, se sube el flujo hasta 0.3 mL/min, y se mantiene el lavado durante al menos 30 min.

4.4. Funcionalización de las columnas con el aptámero tiolado del BPA.

Una vez ya se tiene la columna polimérica, el siguiente paso es su funcionalización con el aptámero tiolado del BPA, etapa en la que se consigue la unión del aptámero a la columna monolítica. Este tratamiento, como se ha comentado en la introducción, es diferente según los grupos funcionales que quedan disponibles para unirse al aptámero en la columna preparada de MAA/EGDMA (grupos OH) o de GMA/DVB (grupos epoxi).

Para poder aplicar la etapa de funcionalización, se requiere una **etapa previa** en la que se ha de **preparar una disolución de aptámero a partir del aptámero comercial**.

4.4.1. Preparación de la disolución de aptámero tiolado de BPA (Apt-SH)

El aptámero adquirido en su forma tiolada es un sólido en el que la cadena de aptámero, está unida mediante un enlace S-S a una cadena hidrocarbonada de 6 carbonos (Cadena-S-S-Aptamero). Para poder trabajar con el aptámero, se ha de romper el enlace tioéter S-S y transformarlo en enlace tiol (-SH), de forma que el aptámero queda unido únicamente al grupo (Apt-SH). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se obtiene una disolución de Apt-SH 91.54 μM :

1. Se centrifuga el vial que contiene el reactivo de aptámero sólido a 10000 rpm durante 3 min (figura 21-A).
2. Se añaden 256 μL de agua libre de DNA, y se homogeneiza agitando con vórtex durante 4 min.
3. Se añaden 14.2 μL de una disolución de Tris-HCl (180 mM, pH 7,4) y 9.3 μL de disolución de TCEP (275 mM), y se homogeneiza la mezcla agitando con vórtex.
4. Se deja la disolución durante 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente para que se produzca la ruptura del enlace S-S.

Una vez tenemos el Apt-SH, el siguiente paso consiste en el plegamiento del aptámero. Para ello, se introduce el vial en un termobloque (figura 21-B) y se deja a 95°C durante 10 min. De esta manera, disponemos de una disolución del aptámero de BPA tiolado y plegado (Apt-SH plegado) 91.54 μM , que puede usarse para funcionalizar las columnas de MAA-EDGMA, una vez vinilizada con VDMES (MAA-EDGMDA-VDMES), y de GMA-DVB.

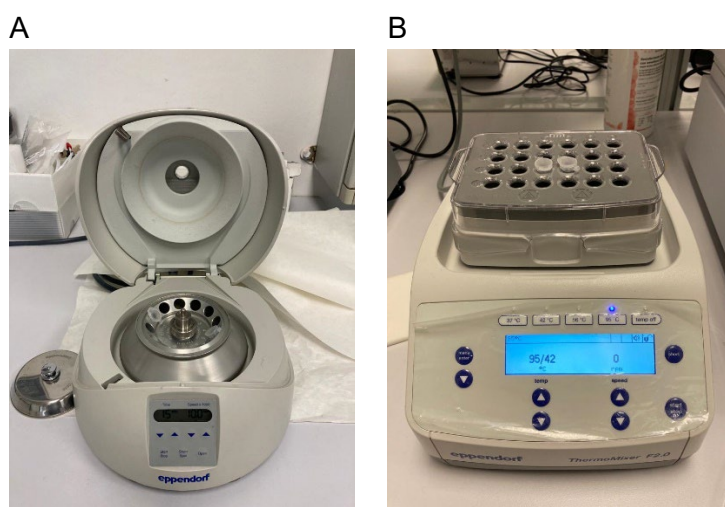


Figura 21. A. Centrifuga empleada en la preparación del aptámero. B. Termobloque en el que se realiza el plegamiento del APT-BPA.

4.4.2. Funcionalización de la columna de MAA/EGDMA con el aptámero

La columna monolítica de MAA/EGDMA se ha de modificar, en primer lugar, con VDMES para que posea dobles enlaces en su estructura que permitan la unión del Apt-SH (figura14), proceso de vinilización.

Se han probado dos métodos diferentes para la reacción con el VDMES y posterior reacción con Apt-SH: en estático y en continuo.

Reacción con VDMES y con Apt-SH en estático

En este procedimiento, para la reacción con VDMES, se hacen pasar 0.7 mL de una mezcla VDMES:MeOH:TEA (1:1:0.06) (v:v:v) con una bomba de jeringa a través de la columna monolítica a un flujo de 1.5 mL/h. Posteriormente, se cierra la columna y se introduce en un horno a unos 80°C durante 24 h. Tras esta etapa, la columna se lava con MeOH en la bomba de HPLC.

Para la reacción de la columna vinilizada en estático con el Apt-SH, se mezclan en un vial Eppendorf 9 mg de AIBN, 0.5 mL de ACN, 0.5 mL de agua Milli-Q y 20 μ L de Apt-BPA tiolado y plegado 91.54 μ M. Se pasa a través la columna la disolución de Apt-BPA con una bomba de jeringa a 0.025mL/min (figura 22). Se cierra la columna con sus tapones y se deja en el horno a 55°C durante 5 h. Para comprobar la reacción entre el aptámero y el polímero, se ha medido la absorbancia inicial de la disolución de aptámero a 260 nm ($t=0$) y trascurridas las 5h de reacción.

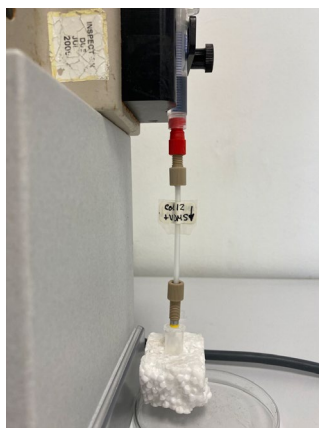


Figura 22. Bomba de jeringa en posición vertical para recoger la disolución a la salida de la columna en la reacción con el aptámero.

Reacción con VDMES y con Apt-SH en continuo

En este procedimiento, para la reacción entre el polímero de la columna y el VDMES, se hacen circular en continuo, a través de la columna situada en un horno a 70°C, 3.09 mL de una mezcla VDMES:MeOH:TEA (1:1:0.06) (v:v:v) con una bomba peristáltica a 0.1 rpm (figura 23-A). Además, el vial se mantiene en atmosfera de N₂ durante el proceso. Como se observa en el esquema de la figura 23B, la disolución se recircula, de forma que se recoge la mezcla a la salida de la columna en el mismo vial del que toma la mezcla la bomba peristáltica, por lo que la reacción se puede mantener en continuo. Una vez acabado el proceso, la columna se limpia con MeOH en la bomba de HPLC.

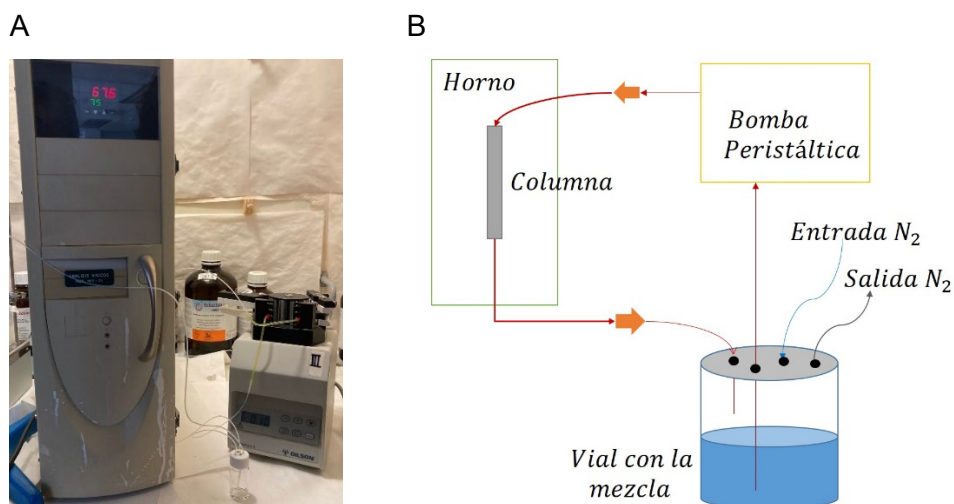


Figura 23. A. Montaje para pasar el VDMES en continuo a través de la columna monolítica polimérica de MAA/EGDMA. B. Esquema del montaje.

Tras la vinilización de la columna, se procede a la funcionalización de la misma con Apt-SH también en continuo. Para ello, se mezclan en un Eppendorf 16.2 mg de AIBN, 0.9 mL de ACN, 0.9 mL de BB, 36 microL de Apt tiolado y plegado 91.54 μ M. La mezcla homogeneizada con vórtex se pasa en continuo a través la columna situada en una estufa a 55°C durante 5 h empleando una bomba de jeringa a 0.2 mL/h (0.0033 mL/min) (figura 24-A). La disolución a la salida de la columna se recoge cada hora para el espectro UV-vis a lo largo del tiempo de reacción. Tras el proceso de adición del aptámero, la columna se lava con MeOH en la bomba de HPLC.

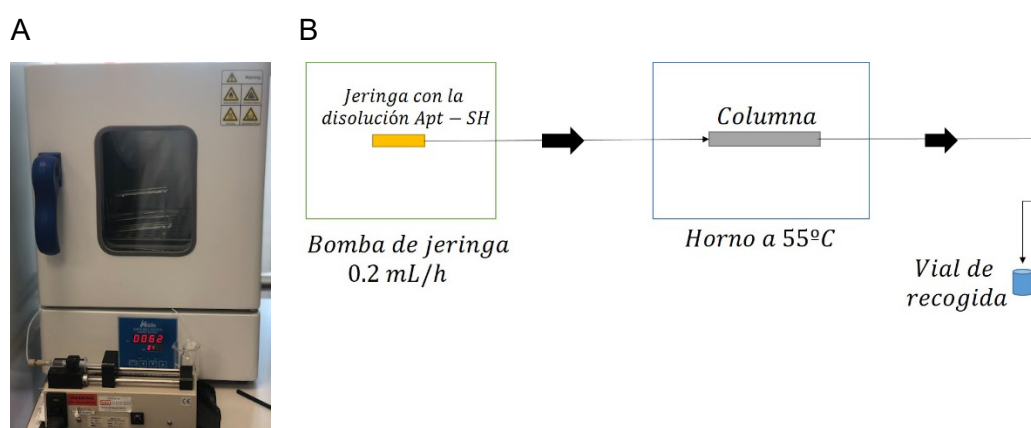


Figura 24. A. Montaje para pasar la disolución de aptámero en continuo a través de la columna monolítica polimérica de MAA/EGDMA. B. Esquema del montaje.

4.4.3. Funcionalización de la columna de GMA/DVB con el aptámero

En las columnas de GMA/DVB no es necesario realizar ningún tratamiento previo a la adición del aptámero ya que el grupo epoxi que presentan en su estructura es capaz de reaccionar directamente con el aptámero tiolado.

Para llevar a cabo la funcionalización de la columna con Apt-SH, se emplearon procedimientos distintos con las columnas de 1.5 o 0.75 mm d.i.

Con las columnas de 1.5 mm d.i. se prepara una mezcla que contiene 0.01358 g TBAS, 0.5 mL de THF, 50 μ L de agua y 11 μ L de disolución de Apt-SH 91.54 μ M. La mezcla homogeneizada se hace pasar con la ayuda de una bomba de jeringa en dos etapas: se pasan 0.2 mL de la mezcla a 0.05 mL/min, se cierra la columna y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 1.5 h; tras este tiempo de reacción, se conecta de nuevo la columna a la bomba de jeringa y se rellena de nuevo con otros 0.2 mL de disolución a 0.05 mL/min, se cierra la columna y se deja reaccionar otras

1.5 horas a temperatura ambiente. La disolución a la salida de la columna se recoge a tiempo 0 y a las 3 horas de reacción para medir el espectro UV-vis y comprobar así la eficacia de la reacción. Tras la reacción, se lava la columna con MeOH empleando la bomba de HPLC.

Con las columnas de 0.75 mm d.i. se prepara una mezcla que contiene 0.0132 g de TBAS, 1 mL de THF, 100 μ L de agua y 22 μ L de disolución de Apt-SH 91.54 μ M. La mezcla homogenizada con vórtex se hace pasar en continuo con la ayuda de una bomba de jeringa a 0.2 mL/hora durante 5h (figura 25). La disolución a la salida de la columna se recoge en un vial y se vuelve a pasar por la columna a 0.1 ml/hora durante otras 10 horas. En esta experiencia, se midió el espectro UV-vis de la disolución a tiempo 0 y tras las 5 horas de reacción. Tras la reacción, se lava la columna con MeOH empleando la bomba de HPLC.

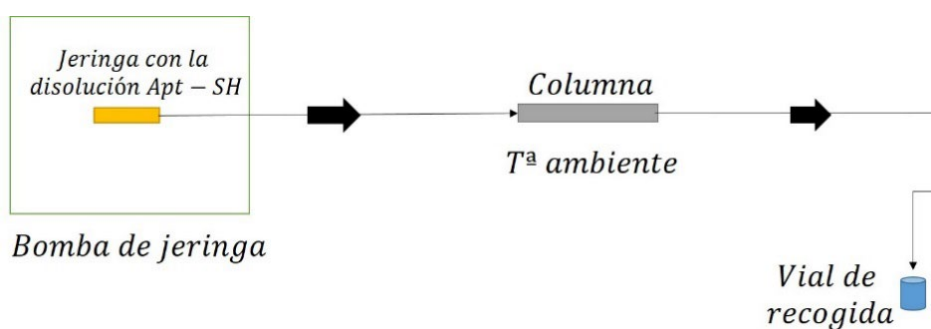


Figura 25. Esquema de adición de la disolución de Apt-SH a la columna de GMA/DVB.

4.5. Estudio de la capacidad de separación del BPA mediante HPLC con las columnas desarrolladas

Las columnas de GMA/DVB y MAA/EGDMA preparadas mediante polimerización térmica y funcionalizadas con el aptámero tiolado del BPA, así como las correspondientes columnas de referencia (sin aptámero), se conectaron al sistema cromatográfico del laboratorio (figura 26) y se testaron como fase estacionaria para el análisis de BPA con detección fluorescente.



Figura 26. Sistema de HPLC de la UPV. 1. Recipientes con la fase móvil. 2. Bomba de alta presión. 3. Inyector automático. 4. Detector de fluorescencia. 5. Columna.

De todos los módulos del sistema que aparecen en la imagen, se usaron los recipientes de la fase móvil, la bomba (en modo isocrático o gradiente dependiendo del ensayo), el inyector automático y el detector de fluorescencia. Para los distintos ensayos, se empleó en general una velocidad de flujo de 0.3 mL/min y se inyectaron en el sistema normalmente 20 μ L de disolución patrón de BPA de 5 ppm preparada en 20 mM BB. Además, en el detector de fluorescencia se fijaron los siguientes parámetros: ganancia de 1000, λ_{exc} = 282 nm; λ_{em} =308 nm).

Con las distintas columnas, funcionalizadas con aptámero y de referencia, se ensayaron trabajando en isocrático fases móviles muy variadas: 100%ACN, 100%Agua, 100%BB, mezclas ACN:Agua en distintas proporciones y mezclas ACN:BB también en distintas proporciones. También se probaron algunos programas de elución en gradiente partiendo de 100%BB y llegando a distintos porcentajes de BB:ACN. Las fases móviles ensayadas con cada una de las columnas se detallarán más concretamente en el apartado de Resultados.

5. Resultados y discusión

En la primera parte del trabajo, se han preparado columnas monolíticas poliméricas empleando dos mezclas diferentes de monómero/entrecruzante/porógeno y se ha aplicado la polimerización con láser y térmica, comprobando si el polímero era homogéneo y quedaba enlazado de forma adecuada a la pared interna del tubo de ETFE modificado.

En la segunda parte, con las columnas poliméricas perfectamente enlazadas al tubo contenedor, se procedió a su modificación química para enlazarle el aptámero específico de BPA. Finalmente, se comparó el comportamiento cromatográfico de las columnas modificadas con el Apt-BPA con el de las columnas monolíticas poliméricas de referencia (no modificadas, sin aptámero) para establecer la posible influencia del aptámero en el proceso de retención del BPA.

Todo ello se describe a continuación, indicando de forma detallada los resultados de las pruebas realizadas.

5.1. Obtención de columnas monolíticas poliméricas en el tubo ETFE

A continuación, se describen los resultados en la obtención de columnas monolíticas poliméricas en el tubo ETFE, mediante iniciación con luz láser y mediante iniciación térmica.

5.1.1. Resultados de la obtención de columnas monolíticas con luz láser azul

El estudio inicial de la polimerización con láser azul se realizó con una mezcla de MAA/EGDMA con un 16% de monómero y un 84% de entrecruzante usando ACN como porógeno y el iniciador Irgacure 819, que es específico para el láser azul (tabla 2) (Muñoz-Bartual, 2023). También se probaron otras proporciones MAA/EGDMA.

En todos los casos, la mezcla desgasificada se introduce en el tubo de ETFE (o PTFE en algún caso) de 1.5 mm i.d. (o 0.75 mm en algunos casos), previamente modificado con BZF/EGMA (o con H₂O₂/H₂SO₄ y GMA/TEA en algún caso) como se describe en la sección experimental.

Como se ha descrito en la parte experimental, se han probado diferentes estrategias de polimerización con el láser. En los primeros ensayos, la luz láser incidía de forma puntual en distintos puntos a lo largo de la columna, que se situó en el fondo de una caja de cartón forrada con papel aluminio, para que la luz del láser pudiera rebotar en todas las direcciones e incidir aún más sobre la columna. En otros casos, se aplicó la irradiación con el láser abierto y la columna se situó en un banco óptico.

Polimerización con irradiación puntual de la luz láser

En el primer ensayo de polimerización con luz láser (**Columna 1**), se usó la mezcla MAA/EGDMA 16%:84% en un tubo de 1.5 mm d.i. y el tubo fue previamente atacado con BZF/EGDMA.

Para la polimerización, se utilizó la caja de aluminio forrada (figura 27-A) en cuyo interior se ubicó la columna en posición horizontal. Sobre la tapa de la caja se hicieron agujeros cada 2 cm para la irradiación puntual con el láser. El láser se dispuso sujeto de forma vertical en un pie a escasos centímetros de la apertura de la caja para asegurar que la luz incidía directamente en la columna en un punto. Los agujeros por lo que no entraba la luz láser se taparon con una tapa de papel aluminio, y el láser se mantuvo irradiando en el centro de la columna durante los 20 min (figura 27-B).

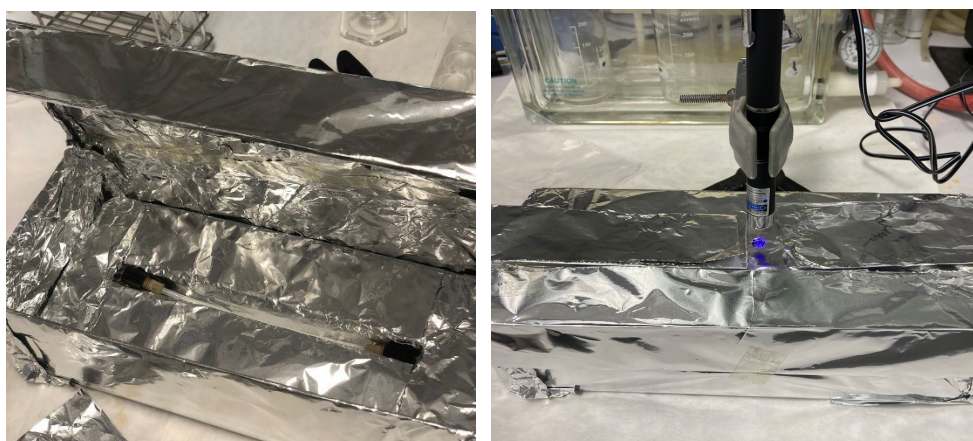


Figura 27. A. Caja para la ubicación de la columna. B. Polimerización con luz láser puntual de la Columna 1.

Tras la irradiación, se sacó la columna y se observó que quedaron zonas sin polimerizar justo cerca del punto de irradiación (figura 28).

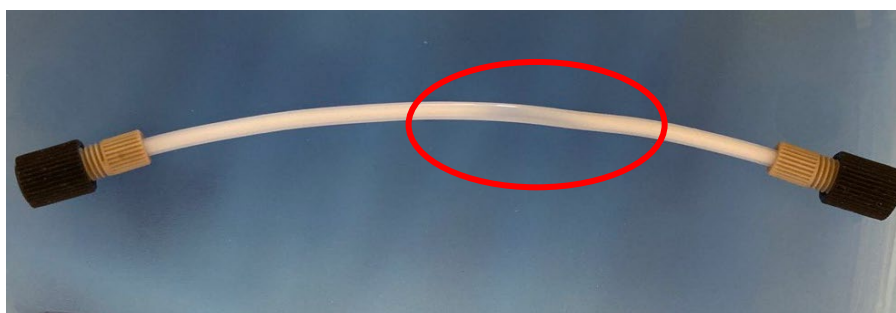


Figura 28. Columna 1 polimerizada mediante láser azul. En el círculo se señala la zona no polimerizada.

Para saber si el polímero se había quedado enlazado a la pared del tubo, se cortó la parte de la columna la Col-1 que no estaba polimerizada, con lo que se quedó una columna con polímero de unos 6 cm, que se lavó con MeOH en un sistema de HPLC.

A un flujo de 0.04 mL/min la presión alcanzó los 30 bar, presión que subió a 60 bar con un flujo de 0.08 mL/min; finalmente el polímero se salió del tubo cuando alcanzó un flujo de 0.2 mL/min (figura 29). Estas altas presiones alcanzadas parecen indicar que el polímero efectivamente estaba anclado a la pared del tubo ETFE, pero se trata de un polímero muy poco poroso probablemente por la gran cantidad de entrecruzante.



Figura 29. Lavado en el sistema HPLC de la Columna 1. En el círculo, se observa la columna saliéndose.

Se realizó una segunda columna (**Columna 2**) con este montaje y la misma mezcla de polimerización. En este ensayo se modificó el tiempo y los puntos de irradiación: el láser se movió de un extremo a otro de la columna (cada 2 cm aproximadamente), manteniendo 7 min la irradiación en cada punto, 6 en total.

La columna polimerizó mejor, aunque en la zona de inicio de la irradiación se observó una zona no polimerizada (figura 30-A). Al lavar esta columna, también acabó saliéndose (figura 30-B).

A



B

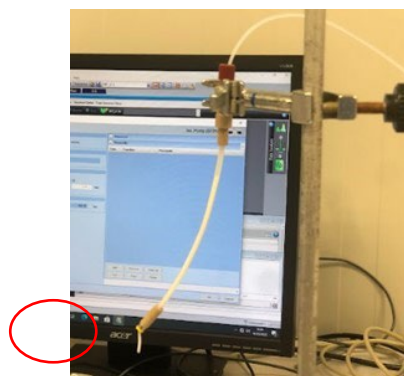


Figura 30. A: columna 2 tras la irradiación; B: columna 2 saliéndose.

Con las **Columnas 3 y 4**, preparadas con la misma mezcla de polimerización, se amplió el número de puntos de irradiación, moviendo el láser cada 0.5 cm, para lo cual se cortó toda la zona de la tapa de la caja que quedaba sobre la columna, y el láser se movió de izquierda a derecha cada 0,5 cm a lo largo de la columna, irradiando 7 minutos en cada punto de irradiación (en total, unos 22 puntos). Como en el caso anterior, las zonas de la caja que quedaban abiertas a los lados del punto de irradiación se taparon con aluminio y, en ningún momento se apagó el láser, hasta que no estuvieron todas las partes de la columna irradiadas.

Para el ensayo de polimerización con estas columnas, se utilizó el tratamiento de ataque del tubo ETFE con $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$ (1:1) y GMA/TEA, como se ha explicado en la sección experimental. La columna 3 se hizo empleando tubo ETFE de 1.5 mm de i.d. y la Columna 4 con tubo de PTFE de 0.8 mm de i.d.. Con estas columnas, que aparentemente eran más homogéneas y sólo presentaban zonas sin polimerizar en los extremos, que se cortaron para el lavado, también se alcanzaron presiones elevadas a flujos de MeOH bajo y acabaron saliéndose del tubo en la etapa de limpieza. Como en los casos anteriores, parece que polímero formado está muy entrecruzado y que sí estaba enlazado a la pared interna del tubo ETFE.

Dada la alta presión que genera el polímero obtenido en estas condiciones, se probó a preparar el polímero empleando mezclas con menor cantidad de entrecruzante. La **Columna 5** se preparó con una mezcla cuya proporción monómero:entrecruzante fue de 40%:60% (1.65 mmoles monómero MAA, 2.49 mmoles de entrecruzante EGDMA). La polimerización se llevó a cabo en tubo de ETFE de 1.5 mm de d.i. cuya pared interna fue tratada con GMA/EGDMA.

Para la polimerización de la Columna 5, se situó la columna en la caja en horizontal, y se fue moviendo el láser cada 1 cm, y se mantuvo 20 min en las dos posiciones iniciales y 10 minutos en las siguientes 10 posiciones. La polimerización no fue homogénea (figura 31), puesto que quedaban huecos en una pared de la columna en las zonas iniciales, en las que se mantuvo la irradiación del láser durante 20 min.

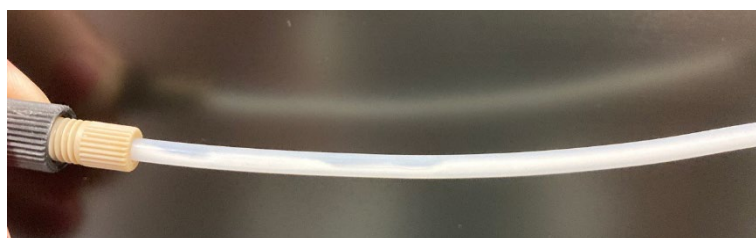


Figura 31. Columna 5 tras la irradiación con láser.

Por otra parte, se cortó la parte de la columna que tenía los huecos y la columna no se salió cuando se conectó al sistema de HPLC para su limpieza. Respecto a la presión, ésta fue muy baja, tanto que la bomba marcaba 0 bar, por lo que pensamos que posiblemente el líquido fluía por la pared sin atravesar el polímero, así que se probó el uso de esta mezcla cambiando las condiciones experimentales de polimerización.

Las **columnas 6 y 7**, preparadas con la misma mezcla y tubo que la anterior, se pusieron en la caja con cierta inclinación (unos 30° y 90° respectivamente) cerrando solo el extremo inferior y dejando abierta la parte de arriba (figura 32). Se empezó a polimerizar desde abajo hacia arriba y el láser se movió de un extremo a otro de la columna cada 1 cm y se irradió con el láser en cada punto durante 10 min, durando el proceso completo unos 120 min. En ambos casos, el montaje se situó en la vitrina.

La polimerización de ambas columnas proporcionó polímeros no homogéneos, con huecos, por lo que se descartó este tipo de polimerización con el láser con irradiación puntual.



Figura 32. Montaje para la polimerización vertical (columna 7) con la columna abierta por el extremo superior.

Polimerización con irradiación con el haz del láser abierto

Dado que no se consiguió con la irradiación puntual con el láser un polímero homogéneo y con una presión de trabajo adecuada, se planteó la posibilidad de irradiar toda la columna a la vez. Para ello, se empleó el montaje descrito en la parte experimental (figura 19) en el que se situó el láser, una lente (varilla de vidrio), y la columna en un banco óptico. El montaje permitió abrir el haz del láser de forma que toda la columna era irradiada a la vez.

Las **Columnas 8 y 9** se prepararon empleando mezclas con una cantidad intermedia de entrecruzante, cuya proporción monómero:entrecruzante fue de 30%:70% (1.24 mmoles monómero MAA, 2.90 mmoles de entrecruzante EGDMA). La polimerización se llevó a cabo en tubo de ETFE de 1.5 mm de d.i. cuya pared interna fue tratada con GMA/EGDMA. El tiempo de irradiación para la polimerización se fijó en 30 minutos para la Columna 8, y en 60 minutos para la Columna 9. En ambos casos, una vez transcurrido el tiempo de polimerización, se observó que el polímero formado era aparentemente homogéneo. Y al poner las columnas a lavar con metanol en el sistema de HPLC, la presión era pequeña (0.6 bar a 0.5 mL/min). Sin embargo, ambas columnas se salieron al poco tiempo de tenerlas limpiando, lo que indicaba que, en estas condiciones, el polímero no estaba bien anclado a la pared interna del tubo de ETFE.

A continuación, se polimerizaron con este sistema otras dos columnas (**Columnas 10 y 11**) empleando la mezcla de polimerización inicial (16%MAA:84%EGDMA), en tubo ETFE de 1.5 mm tratado con BZF/EGDMA.

La Columna 10, que se mantuvo con irradiación durante 60 min, cuando se conectó al sistema de HPLC para su lavado se soltó del soporte, indicando que el polímero no estaba correctamente anclado a la pared del soporte. Lo mismo sucedió con la columna 11 en la que se modificó un poco el banco óptico, de manera la columna estaba más cerca al haz de luz y se mantuvo bajo irradiación durante 120 min.

Tras los ensayos con el láser, en los que en ningún caso se consiguió un polímero homogéneo, bien anclado al soporte, y con una presión adecuada para trabajar en HPLC, se procedió a emplear la polimerización térmica.

5.1.2. Resultados de la obtención de columnas monolíticas empleando polimerización térmica

El estudio de la polimerización térmica se realizó con las mezclas detalladas en la parte experimental (tablas 3 y 4): MAA/EGDMA/ACN empleando AIBN como iniciador térmico y GMA/DVB/THF/1-dodecanol empleando LPO como iniciador térmico (Beltrán Martí, 2019; Domingo Martí, 2018). Las columnas se prepararon en tubo de ETFE de 1.5 o 0.75 mm d.i., previamente modificado con BZF/EGMA como se describe en la sección experimental.

Polimerización térmica con mezclas de MAA/EGDMA/AIBN

Como se ha descrito en la parte experimental, la polimerización se llevó a cabo en estufa a 60°C durante 24 horas. Con esta mezcla se realizaron 5 columnas, 3 en un tubo ETFE de 1.5 mm de d.i. (Columnas 12, 13 y 14) y 2 en tubo ETFE de 0.75 mm de d.i. (Columnas 15 y 16). En este caso, todas las columnas eran aparentemente homogéneas.

Por una parte, las columnas realizadas en el tubo más grueso (1.5 mm de d.i., columnas 12 a 14) aguantaron la limpieza en el HPLC con MeOH, y dieron valores de presión adecuados (del orden de 1 bar a 0.5 mL/min) para poder trabajar con ellas y modificarlas con aptámero.

Por otra parte, las columnas realizadas en el tubo ETFE más estrecho (0.8 mm d.i., columnas 15 y 16) se rompieron en el proceso de limpieza con MeOH porque se alcanzaron presiones muy elevadas a flujos bajos (del orden de 39 bar a 0.2 mL/min), posiblemente debido a un mayor entrecruzamiento del polímero.

Polimerización térmica con mezclas de GMA/DVB/LPO

Como se ha descrito en la parte experimental, la polimerización se llevó a cabo en estufa a 70°C durante 4 horas. Con esta mezcla se realizaron 4 columnas, dos en tubo ETFE de 1,5 mm de d.i. (Columnas 17 y 18) y dos en tubo ETFE de 0,8 mm de d.i. (Columnas 19 y 20). En este caso, las columnas fueron aparentemente homogéneas y, tras la limpieza en el HPLC con MeOH, dieron valores de presión adecuados (del orden de 2.2 bares las columnas de 0.75 mm d.i. y del orden de 0.3 bares las columnas de 1.5 mm d.i.) para poder trabajar con ellas y modificarlas con el aptámero.

5.2. Resultados de modificación de las columnas monolíticas con el aptámero

Como se ha comentado, con cada tratamiento de polimerización térmica, se obtuvieron varias columnas con cada mezcla. Una de las columnas se guardó como columna de referencia y no se modificó, y las otras se modificaron para intentar unirle el aptámero específico del BPA.

El aptámero tiolado del BPA se intentó enlazar a las Columnas 13 y 14 de MAA/EGDMA/AIBN (columnas de 1.5 mm d.i.) empleando procedimientos de reacción en estático y en continuo, respectivamente; también se intentó enlazar el aptámero a las Columnas 18 y 20 de GMA/DVB (columnas de 1.5 y 0.75 mm d.i.) empleando procedimientos de reacción con el aptámero en estático (3 horas de reacción) y en continuo (15 horas en total), respectivamente.

En primer lugar, la columna polimérica de MAA/EGDMA/AIBN (Columna 13, 1.5 mm d.i.) obtenida mediante polimerización térmica, fue tratada con VDMES en estático previo a la reacción de unión del aptámero tiolado del BPA también en estático. Durante la reacción de unión del aptámero a dicha Columna 13, se midió la absorbancia de la disolución de salida de la columna a 260 nm al principio ($t=0$) y trascurridas 5 horas de reacción, para comprobar si el aptámero había quedado unido a la columna. En el espectro de absorción (figura 33), se observó que, tras las 5 horas de reacción a 55°C, se produce un cambio en la absorbancia a 260 nm de la disolución de salida de la columna (pico típico del aptámero).

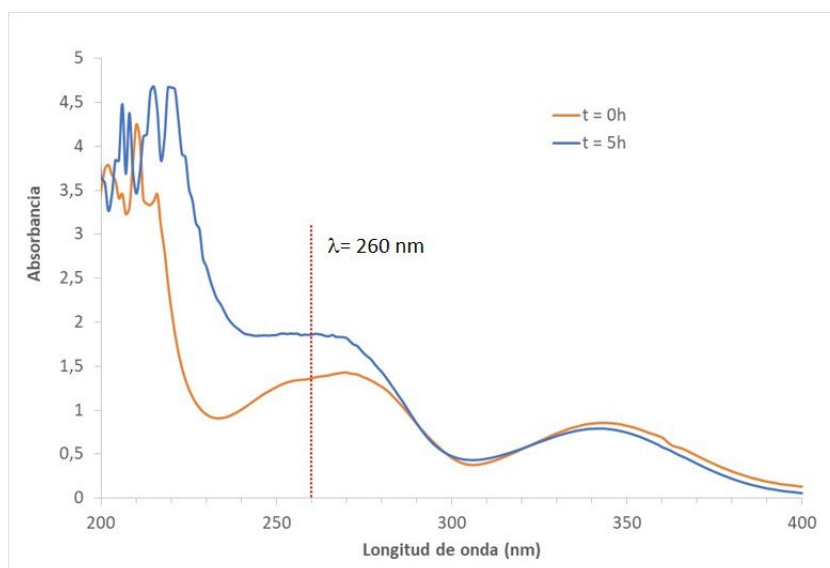


Figura 33. Espectro UV-vis de la disolución de Apt-SH a tiempo 0 y a la salida de la columna al cabo de 5 horas de reacción.

Cabría esperar una disminución en la absorbancia de la disolución de salida, que indicaría que parte o todo el aptámero ha quedado unido al polímero. Sin embargo, se observa un aumento de la absorbancia a esta longitud de onda. Este aumento de la absorbancia puede deberse a la formación de sub-productos que absorben a esta longitud de onda (según hemos visto en estudios anteriores con aptámeros, Torres-Cartas, S. y col, 2023). Por ello, tras la medida del espectro, no queda claro si el aptámero ha quedado unido o no al polímero, y sólo podría confirmarse la reacción haciendo otro tipo de estudios sobre el polímero, como un análisis de FT-IR. Como

en el laboratorio no se dispone de esta técnica, la única forma de saber si el aptámero ha quedado enlazado, es comparando los resultados de separación mediante HPLC con las columnas de aptámero y de referencia (siguiente apartado).

En segundo lugar, la Columna 14 (de MAA/EGDMA/AIBN, 1.5 mm d.i.) fue tratada con VDMES en continuo y posteriormente con el aptámero tiolado del BPA también en continuo. En la reacción de unión del aptámero a la Columna 14, se midió la absorbancia de la disolución de salida de la columna a 260 nm al principio ($t=0$) y cada hora hasta las 5 horas de reacción. En el espectro de absorción (figura 34), se observó un gran aumento de la señal a 260 nm a partir de 1 hora de reacción, lo que indica que se está produciendo alguna reacción, posiblemente la unión del aptámero junto a otras reacciones secundarias. Dado que la unión del aptámero sólo se podría confirmar mediante FT-IR y no se dispone de dicha técnica en el laboratorio, se intentó confirmar la unión del aptámero a la columna comparando los resultados de separación mediante HPLC con las columnas de aptámero y de referencia (siguiente apartado).

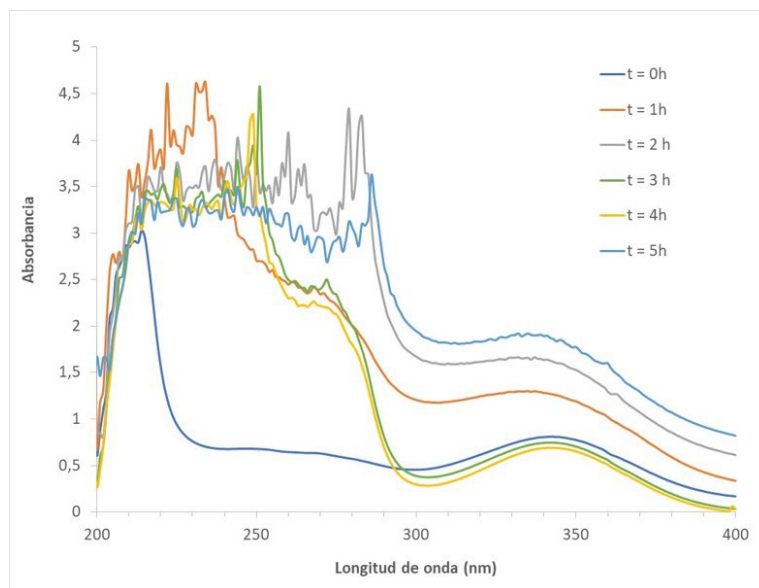


Figura 34. Espectro UV-vis de la disolución de APT-BPA a la salida de la columna a tiempo 0 y a lo largo de 5 horas de reacción.

En tercer lugar, se aplicó la reacción con el aptámero en estático a la Columna 18 (de GMA/DVB/LPO, 1.5 mm d.i.). La columna fue tratada directamente con el aptámero tiolado del BPA en estático en 2 etapas de 1.5 horas. En el registro de los espectros a tiempo 0 y a las 3 horas de reacción (figura 35), se observó una disminución de la absorbancia a 260 nm en la disolución de salida tras la reacción, lo que indicaba que al menos una parte o todo el aptámero ha quedado unido al polímero empleando el procedimiento señalado.

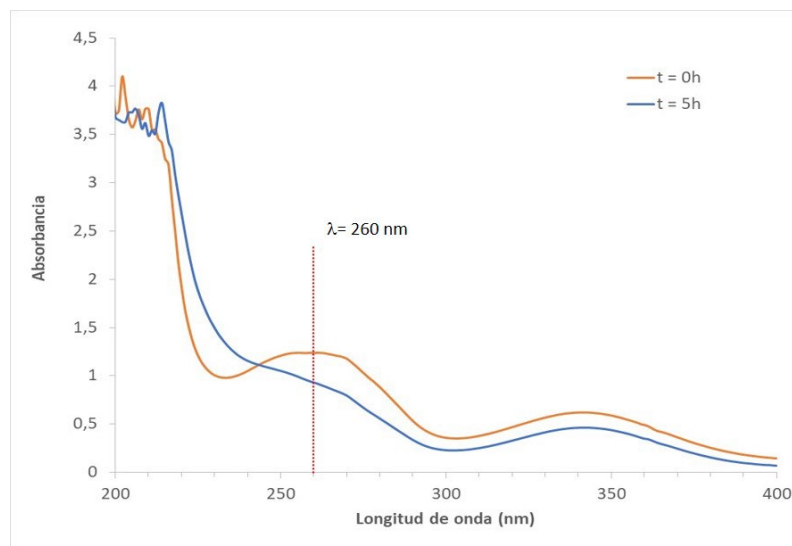


Figura 35. Espectro UV-vis de la disolución de APT-BPA a la salida de la columna a tiempo 0 y a las 3 horas de reacción en estático.

Por último, para la columna de GMA/DVB/LPO de 0.75 mm d.i. (Columna 20), que tuvo un procedimiento de reacción del aptámero en continuo que duró un total de 15 horas, se registraron los espectros UV-vis a tiempo 0 y a las 5 horas de reacción. En el registro de los espectros a tiempo 0 y a las 5 horas de reacción (figura 36), se observó también una disminución de la absorbancia a 260 nm en la disolución de salida tras la reacción, por lo que, al igual que con las columnas de 1.5 mm, se puede afirmar que al menos una parte o todo el aptámero ha quedado unido al polímero empleando el procedimiento señalado.

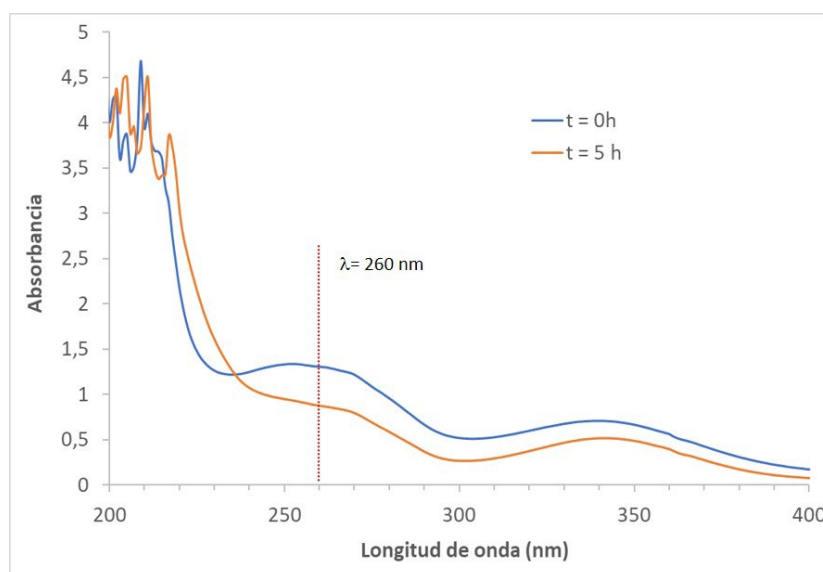


Figura 36. Espectro UV-vis de la disolución de APT-BPA a la salida de la columna a tiempo 0 y a las 5 horas de reacción en continuo.

5.3. Resultados de separación de BPA con las columnas modificadas con aptámero y sus columnas de referencia

Para poder comprobar la presencia del aptámero y su influencia en la separación del BPA en las columnas obtenidas mediante polimerización térmica, además del estudio de los espectros UV-vis a lo largo de la reacción de adición del aptámero, se estudió la capacidad de separación cromatográfica del BPA empleando las distintas columnas. Se comparó siempre el comportamiento cromatográfico en la determinación de BPA para las columnas modificadas con aptámero y sus correspondientes columnas de referencia (sin modificar).

Las columnas se conectaron al sistema HPLC y se procedió al análisis de un patrón de BPA preparado en BB (normalmente de 5 ppm), empleando distintas fases móviles. En el estudio se han empleado mayoritariamente fases móviles en modo isocrático, ya que el empleo de gradientes generaba problemas de inestabilidad en la señal registrada y los picos de BPA salían justo en la zona que correspondía al cambio de fase.

5.3.1. Análisis cromatográfico de BPA con las columnas de MAA/EGDMA/AIBN

Empleando como fase estacionaria en HPLC la **columna de referencia** de MAA/EGDMA/AIBN (**columna 12**, 1.5 mm d.i.) se probaron como fase móvil en modo de separación isocrático varias mezclas ACN:Agua (entre 20-100%ACN) y ACN:BB (entre 0-30%ACN), generalmente con flujo 0.3 mL/min. No se observaron diferencias al emplear agua o BB en la fase móvil. Con estas fases móviles, el BPA quedaba retenido en la columna con %ACN menores o igual al 20%. Con %ACN superiores, el BPA salía en el frente del cromatograma, es decir, no se retenía en la columna.

Estos mismos ensayos se realizaron empleando la **columna modificada con el aptámero en estático (Columna 13**, 1.5 mm d.i.), observándose con la columna modificada un comportamiento idéntico al de la columna de referencia en la retención de BPA.

Algunas de las razones que pueden explicar la falta de diferencia en el comportamiento cromatográfico en la retención de BPA entre la columna con aptámero 13 y la columna de referencia 12 pueden ser: que la modificación con el reactivo VDMES no hubiera generado suficientes puntos de anclaje para el aptámero, que la cantidad de aptámero enlazado a la columna monolítica era insuficiente, o que el aptámero no se había unido a la columna, entre otras.

Tras los resultados poco esperanzadores de la Columna 13, se realizó un cambio en los procesos de adición del VDMES y del aptámero, llevándose a cabo ambas etapas en continuo, y se obtuvo la columna 14 modificada con aptámero (de MAA/EGDMA/AIBN, 1.5 mm d.i.).

Se realizó un estudio de **comparación del comportamiento cromatográfico de retención de BPA con las columnas 12 y 14**. En este caso, se utilizó una fase móvil BB:ACN en modo gradiente a 0.5 mL/min con un tiempo total de análisis de 16 minutos (tabla 5).

Tabla 5. Gradiente empleado en el ensayo de retención del BPA con fase móvil BB:ACN.

Tiempo (minutos)	%BB	%ACN
0	100	0
4	70	30
10	70	30
11	100	0
16	100	0

En la figura 37 se muestra el cromatograma obtenido con el programa de gradiente indicado con las columnas 12 y 14. Puede observarse que el pico que se obtiene con la Columna 13 (referencia) es más ancho, mientras que el pico que se obtiene con la Columna 14 (modificada con aptámero) presenta una zona más estrecha, pero tiene una cola, que podría deberse a la interacción del BPA con la estructura básica del polímero. Este comportamiento parece indicar que la presencia del aptámero del BPA en la columna produce resultados distintos y parece que tiene un papel significativo en los procesos de retención de BPA en la columna cromatográfica. Por otra parte, el tiempo de retención del pico de BPA es casi el mismo con ambas columnas (7.14 y 7.07 min con la columna de referencia y de aptámero, respectivamente), lo que podría indicar que la concentración del aptámero en la columna puede no ser suficiente para que éste sea el único mecanismo de retención.

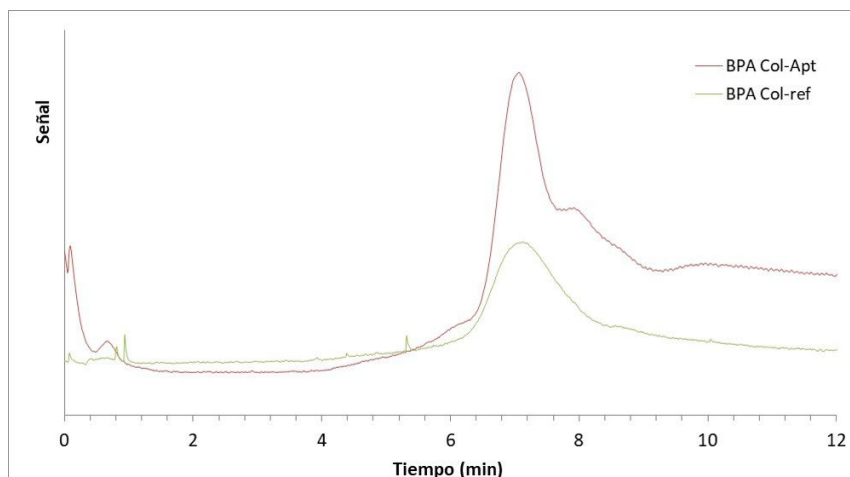


Figura 37. Cromatogramas obtenidos en la determinación cromatográfica de BPA en modo gradiente con las columnas 12 y 14.

5.3.2. Análisis cromatográfico de BPA con las columnas de GMA/DVB/LPO

Las columnas de referencia 17 y 19 (de 1.5 y 0.75 mm d.i.) y las columnas modificadas con aptámero 18 y 20 (de 1.5 y 0.75 mm d.i.) se acoplaron al sistema cromatográfico ensayándose el análisis de un patrón de BPA (normalmente de 5 ppm en BB) empleando distintas fases móviles en modo isocrático.

En primer lugar, se realizó un **estudio comparativo** de comportamiento de retención de BPA **con las columnas monolíticas de GMA con 1.5 mm de d.i. (Columnas 17 y 18**, de referencia y modificada con aptámero, respectivamente). Resaltar que con la columna 18 la modificación con el aptámero se hizo en una reacción que se llevó a cabo en estático en 2 etapas de 3 horas en total.

Con ambas columnas, se estudió la retención del BPA empleando varios porcentajes ACN:Agua y ACN:BB con flujo 0.3 mL/min, variando los porcentajes de ACN entre un 30 y un 45%. Los resultados de retención fueron similares al emplear agua o BB combinado con el ACN. Tanto con agua como con BB, la columna con aptámero (Columna 18), requería al menos un 40% de ACN para eluir el BPA de la columna. Sin embargo, con la columna de referencia (Columna 17) el BPA sí se eluía de la columna con sólo un 30% de ACN en la fase móvil. Estos resultados indicaron que el aptámero juega un papel relevante en los procesos de retención del BPA en la columna monolítica de GMA sintetizada.

En la figura 38 se muestra un cromatograma de BPA con las columnas 17 y 18 (de GMA/DVB/LPO, 1.5 mm d.i.) con una fase móvil isocrática con un 40% de ACN:60%BB. El pico se ensancha al emplear la columna con aptámero. Y el tiempo

de retención del BPA con la columna de referencia fue de 2.29 y con la columna modificada fue de 2.83.

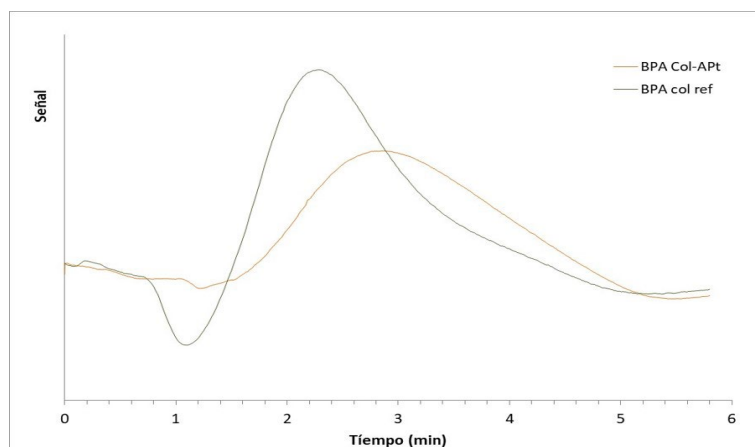


Figura 38. Cromatogramas obtenidos en la determinación cromatográfica de BPA con fase móvil 40%ACN:60%BB con las columnas 17 y 18.

Se realizó un **estudio comparativo** similar de comportamiento de retención de BPA con las columnas monolíticas de GMA con 0.8 mm de d.i. (Columnas 19 y 20, de referencia y modificada con aptámero, respectivamente). Resaltar que con la columna 20, la modificación con el aptámero se hizo en una reacción que se llevó a cabo en continuo con un total de 15 horas de reacción. En este caso, además de diferenciar entre el comportamiento de las columnas sin y con aptámero, al tratarse de columnas con menor cantidad de polímero, nos permitió comprobar que el tratamiento de adición del Apt-BPA era más eficiente.

Se probaron en primer lugar distintos porcentajes ACN:Agua para la fase móvil fluyendo a 0.3 mL/min (tabla 6) e inyectando 1 μ L de un patrón de BPA de 20 ppm.

Tabla 6. Resultados de retención de BPA con las columnas de GMA/DVB y fase móvil ACN:Agua.

Fase móvil %ACN:%Agua	Tiempo de retención del BPA (min)	
	Columna 19 (referencia)	Columna 20 (modificada aptámero)
50:50	0.75	0.82
40:60	1.04	1.2
30:70	2.04	2.4

Al reducir el %ACN en la fase móvil, se observó un aumento del tiempo de retención, que fue ligeramente mayor con la columna 20 (modificada con aptámero), lo que indicaba una ligera influencia en la retención del BPA en la columna con la presencia del aptámero en la misma.

En segundo lugar, se probaron fases móviles ACN:BB en isocrático con un 30% ACN:70%BB y un 40%ACN:60%BB a un flujo de 0.3 mL/min e inyectando 1 μ L de un patrón de BPA de 20 ppm. En ambos casos, el tiempo de retención del BPA es algo mayor con la columna modificada con Apt-BPA. Con la fase móvil 40%ACN:60%BB, los tiempos de retención fueron de 0.83 min con la columna 19 (referencia) y de 1.00 min con la columna 20 (aptámero). En el cromatograma de la figura 39, se observa que el BPA sale a un tiempo de retención de 2.14 min con la columna 20 y de 1.75 min con la columna 19 con una fase móvil 30%ACN:70%BB a 0.3 mL/min. Esta diferencia en el comportamiento de retención de BPA en la columna modificada con aptámero parece indicar que el aptámero sí ha quedado retenido en la columna y parece que juega un papel importante en el proceso de retención del BPA, mayor cuando la fase móvil contiene un mayor porcentaje de BB.

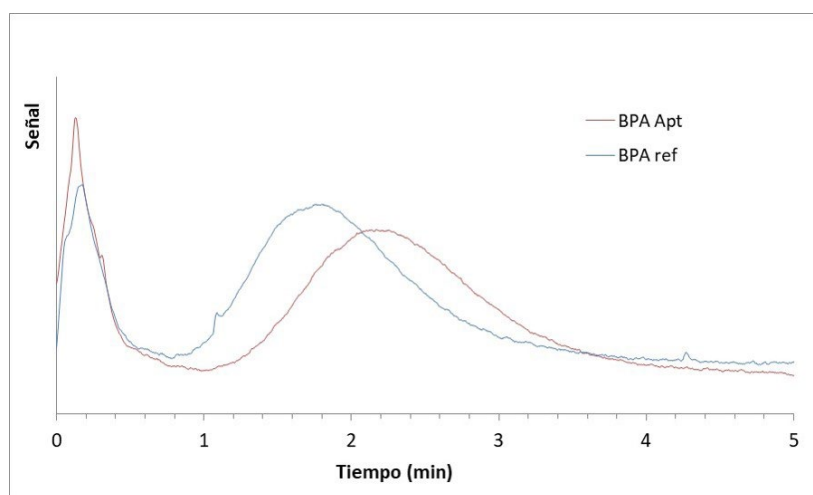


Figura 39. Cromatogramas obtenidos en la determinación cromatográfica de BPA con fase móvil 30%ACN:70%BB con las columnas 19 y 20. Vinjección: 1 μ L de BPA 20 ppm.

La retención parece que es similar con la fase móvil es ACN:agua o ACN:BB.

Por último, si se comparan los resultados de separación con las columnas de 0.75 y 1.5 mm d.i. en las que el tratamiento de adición del aptámero fue diferente, se deduce lo siguiente: dado que la diferencia en los tiempos de retención columna referencia-columna aptámero era mayor con la columna de 0.75 mm d.i. (tratada en continuo durante 15 horas en total) que con la columna de 1.5 mm d.i. (tratada en estático con un tiempo total de 3 horas), se considera que el tratamiento de 15 horas en continuo fue más efectivo para la unión del aptámero al polímero.

6. Conclusiones

Tras la realización de este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- En la preparación de columnas poliméricas de MAA mediante irradiación con luz láser azul mediante irradiación puntual:
 - Las columnas con un 16% de MAA generaban polímeros no homogéneos, con zonas no polimerizadas en las diferentes estrategias empleadas. Además, los fragmentos de columna que presentaban continuidad en la estructura daban presiones muy altas al lavarse y acabaron saliéndose del tubo contenedor. Esto se observó tanto con el ataque de la pared interna del tubo ETFE con BZF/EGDMA como con $H_2O_2/H_2SO_4/GMA/TEA$ no permitía el anclaje del polímero a la pared del tubo.
 - Las columnas con mayor porcentaje de MAA (40%) también generaron polímeros no homogéneos.
- En la preparación de columnas poliméricas de MAA empleado iniciación con luz láser azul mediante irradiación con el haz abierto en un banco óptico, tanto las columnas preparadas con un porcentaje de MAA de 16% como las preparadas con %MAA 30% dieron aparentemente polímeros homogéneos, pero no estaban anclados a la pared del soporte.
- Tras los resultados con la iniciación mediante láser, se descarta el empleo de este tipo de iniciación para la síntesis del polímero en formato columna en un tubo ETFE.
- En la preparación de columnas poliméricas mediante polimerización térmica:
 - Las columnas de MAA/EGDMA dieron polímeros homogéneos y con presiones de trabajo adecuadas sólo cuando el soporte empleado era tubo ETFE de 1.5 mm.
 - Las columnas de GMA/DVB dieron polímeros homogéneos y con presiones de trabajo adecuadas al emplear como soporte tubo ETFE de 1.5 mm y de 0.75mm.
- En cuanto a la modificación de las columnas monolíticas obtenidas con polimerización térmica con el aptámero tiolado del BPA:
 - El estudio del espectro UV-vis durante la reacción con las columnas de MAA/EGDMA modificadas con VDMES y con Apt-SH en estático o en continuo indicó un cambio en la absorbancia a 260 nm que podría confirmar la unión del aptámero junto a otras reacciones secundarias.

- El estudio del espectro UV-vis durante la reacción empleando las columnas de GMA/DVB modificadas con Apt-SH en estático o en continuo, indicó una disminución en la absorbancia a 260 nm que podría confirmar la unión del aptámero a la columna.
- Al comparar el comportamiento cromatográfico en el análisis de BPA empleando las columnas de referencia y su correspondiente columna modificada con aptámero:
 - La columna de MAA/EGDMA modificada con aptámero en estático dio comportamientos similares a su columna de referencia, ya que no había diferencias en el análisis cromatográfico del BPA debidas a la presencia de aptámero en la columna.
 - La columna de MAA/EGDMA modificada con aptámero en continuo dio un pico para BPA más estrecho que su columna de referencia, por lo que se deduce que el aptámero de BPA retenido en la columna tiene un papel significativo en el proceso de retención de dicho compuesto.
 - La columna de GMA/DVB modificada con aptámero en estático dio algo más de retención en el análisis del BPA que su correspondiente columna de referencia. Y lo mismo ocurrió con la columna modificada en continuo, siendo esta última la que presenta una mayor retención del BPA.

Con las conclusiones extraídas del presente estudio, para estudios posteriores se propone optimizar la cantidad de aptámero anclada a la columna para conseguir una separación cromatográfica más selectiva para el BPA empleando las columnas de GMA/DVB.

7. Contribución de este TFG a los objetivos de desarrollo sostenible

Este TFG puede enmarcarse en los siguientes tres OSDs:

- ODS 3, *Salud y bienestar*, puesto que se está trabajando en el desarrollo de una columna que pueda utilizarse para la determinación selectiva de BPA, un compuesto altamente nocivo para la salud.
- ODS 6, *Agua limpia y saneamiento*, dado que la determinación de BPA es un parámetro de gran interés para establecer la calidad de las aguas.
- ODS 9, *Industria, innovación e infraestructura*, al trabajar en el desarrollo de un nuevo material para la determinación selectiva de BPA.

8. Bibliografía

1. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2021. <https://www.aesan.gob.es>. Fecha de consulta: 18/07/2023.
2. ApuntesDe. <https://apuntesde.es/como-funciona-un-hplc>. Fecha de consulta: 10/03/2023.
3. Baz, L.; Alharbi A. Al-Zahran M.; Alkhabbaz S. Alsousou R., Aljawadri H. *The Effect of Different Storage Conditions on the Levels of Bisphenol A in Bottled Drinking Water in Jeddah City, Saudi Arabia*. 2023. *Advances in Public Health*, vol 2023. ID8278428, pages 6.
4. Beltrán Martí, R. *Desarrollo y aplicación de un polímero de impronta molecular para la extracción del plaguicida MCPA en muestras de agua*. Universitat Politècnica de València. 2019. <http://hdl.handle.net/10251/126134>.
5. Caniego Ballesteros, X. *Análisis de Bisfenol A en Lixiviados de Microplásticos*. 2022. <http://hdl.handle.net/10251/188089>.
6. Catalá-Iardo, M. Torres-Cartas S. Meseguer-Lloret S. Gómez-Benito C. Carrasco-Correa, E. Simó-Alfonso, E.F. Ramis-Ramos, G. Herrero-Martínez J.M. *Preparation of organic monolithic columns in polytetrafluoroethylene tubes for reversed-phase liquid chromatography*. 2017 *Analytica Chimica Acta* vol 960, 160-167.
7. Catalá-Iardo, M. Torres-Cartas, S. Meseguer-Lloret, S. Simó-Alfonso, E.F. Herrero-Martínez, J.M. *Photografted fluoropolymers as novel chromatographic supports for polymeric monolithic stationary phases*. 2018. *Talanta* 187, 216-222.
8. Ceballos-Luna V. Chávez-Flores D. Martínez-Serrano I. Rocha-Gutierrez B.A., Nevárez-Rodríguez M. C, and G. Beltrán Blanca,. *Bisphenol and Phthalate Migration Test from Mexican Meat Packaging Using HPLC-DAD Technique*. 2021. *Journal of Chemistry*. Volume 2022, Article ID 2688236, 10 pages.
9. De-la-Torre, G.E. *Microplásticos en el medio marino: una problemática que abordar*. *Revista Ciencia y Tecnología*, 2019. 15 (4), 27-37. <https://www.aacademica>.

10. Dos Santos Costa M.J, Silva Araújo J.V, Lopes Moura J.K, Da Silva Moreno L.H, Assunção Pereira P.Da Silva Santos R., Rodarte Moura C.V. *A Brief Review of Detection and Removal of Bisphenol A in Aqueous Media*. 2022. *Water Air Soil Pollut*, vol, 233 -362.
11. Domingo Martí, M. (2018). *Caracterización y aplicaciones potenciales de una columna monolítica funcionalizada con magnetita*. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/107529>.
12. Ecverde, <https://economiacircularverde.com/que-es-el-bpa/>, Fecha de consulta: 05/08/23.
13. EFSA *El bisfenol A en los alimentos constituye un riesgo para la salud*. 2023. <https://www.efsa.europa.eu/es/news/bisphenol-food-health-risk>, Fecha de consulta: 03/08/2023.
14. Galán Marrero B. *Lixiviación de bisfenol A de microplásticos de policarbonato empleando distintas matrices acuosas de la zona costera*. 2023. Universitat Politècnica de València.
15. Gestores de Residuo. <https://gestoresderesiduos.org/noticias/la-clasificacion-de-los-plasticos>. Fecha de consulta: 15/07/2023
16. Giorgia Potortì A. Litrentaa F. Sgrò B. Di Bellaa G. Albergamo A. Mansour Hedi Ben, Beltifa A. Benameur Q. and Turco V. Lo. *A green sample preparation method for the determination of bisphenols in honeys*. 2023. *Green Analytical Chemistry*. Volume 5, 100059.
17. Juan-García, A., Gallego, C., & Font, G. *Toxicidad del Bisfenol A: Revisión*. 2015. *Revista de Toxicología*, 32(2), 144-160.
18. Krivohlavek A, Mikulec N, Budeč M, Barušić L, Bošnjir J, Šikić S, Jakasa I, Begović T, Janda R, Vitale K. Migration of BPA from Food Packaging and Household Products on the Croatian Market. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2023; 20(4):2877.
19. Kubica P, Pielaszewska M, Jatkowska N. *Analysis of bisphenols and their derivatives in infant and toddler ready-to-feed milk and powdered milk by LC-MS/MS*. 2023. Volume 120,105366.
20. Lestido-Cardama A, Vázquez Loureiro P, Sendón R, Paseiro Losada P, Rodríguez Bernaldo de Quirós A. *Application of chromatographic analysis for detecting components from polymeric can coatings and further determination in beverage sample*. 2021. *Journal of Chromatography A*. Volume 1638, 461886.

21. Muñoz-Bartual M., Herrero-Martínez J.M, Esteve-Turrillas F.A .*Development of paper-immobilized molecularly imprinted polymers by laser pointer activation for methamphetamine extraction with analysis by ion mobility spectrometry*, 2023. Journal of Chromatography A 1692, 463852.
22. Museo Nacional de Ciencias Naturales, “*Conceptos fundamentales de cromatografía*”,<https://www.mncn.csic.es>. Fecha de consulta: 10/08/2023.
23. National geographic, https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/innovacion-para-conseguir-degradar-plastico_15059. Fecha de consulta: 15/07/23.
24. Nehring,I., Staniszewska ,M. y Bodziach,K. .*Distribution of Phenol Derivatives by River Waters to the Marine Environment (Gulf of Gdansk, Baltic Sea)*. 2023, Oceanological and Hydrobiological Studies 52(1) 90-101.
25. Parto M, Aazami J, Shamsi Z, Zamani A. Savabieasfahani M . *Determination of bisphenol-A in plastic bottled water in markets of Zanjan, Iran*. 2022. International Journal of Environmental Science and Technology. 19, pages3337–3344.
26. ORBES: world news, science, technology, nutrition, finance. <https://orbesargentina.com/bisfenol-a-se-encuentra-en-la-sangre/>. Fecha de consulta: 28/08/23.
27. PLAREMESA. *Resina epóxica* < <https://www.plaremesa.net/resina-epoxica/>> Fecha de consulta: 01/08/2023.
28. Reglamento UE 10/2011 de la Unión Europea por el que se establecen las normas para aquellos materiales y objetos de plástico destinados a entrar en contacto con alimentos.
29. Requena A., R. Quintanilla, J.M. Bolarín, A. Vázquez, A. Bastida, J. Zúñiga y L.M. Tomás. *Nuevas Tecnologías y Contaminación de Atmósferas, para PYMEs*. Capítulo VI-1-2, Universidad de Murcia. Spain
30. Sarria-Villa Rodrigo A. y Gallo-Corredor J.A, *La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos*. 2016. Jou.Cie.Ing. 8 (1): 21-27, ISSN 2145-2628.

31. Sbarbati Nudelman, N. *Residuos plásticos en Argentina: su impacto ambiental y en el desafío de la economía circular*. 2020. ANCEFN - Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 1ª ed volumen combinado. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/129919/CONICET_Digital_Nro_4888d95c-638c-482d-badc-3789e2e67940_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Fecha de consulta: 20/08/2023
32. Schiano, M.E., Abduvakhodov A. Varra M., Albrizio S. *Aptamer-Based Biosensors for the Analytical Determination of Bisphenol A Foodstuffs*. *Foodstuffs*. *Appl. Sci.* 2022, 12, 3752.
33. Schmidt M. E. P., Bottoli C. B. G. *Synthesis of Hybrid Monolithic Columns Using a Click Chemistry Reaction for Application in Capillary Liquid Chromatography*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2019, 30 (12) 2590-2598).
34. Sigmaadrich. Columnas para HPLC. 2023. <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/products/analytical-chemistry/analytical-chromatography/hplc-columns>). Fecha de consulta: 30/07/2023
35. Stuparu M.C., Khan A. *Thiol-Epoxy "Click" Chemistry: Application in Preparation and Postpolymerization Modification of Polymers*. 2016. *Journal of polymer science, Part A: Polymer Chemistry* 54 3057–3070).
36. Szubartowski S, Tuzimski T. A Fast Method for Determination of Seven Bisphenols in Human Breast Milk Samples with the Use of HPLC-FLD. 2023. *Molecules* Feb 2;28(3):1432.
37. Ten Doménech, I. Martínez-Pérez-Cejuela H. Simó-Alfonso E.F., Torres-Cartas S. Meseguer-Lloret S. Herrero-Martínez J.M. *Polymer-based materials modified with magnetite nanoparticles for enrichment of phospholipids*. 2018. *Talanta* 180, 162-167.
38. Torres Cartas, S. Meseguer-Lloret, S. Gómez-Benito, C. Catalá-Icardo M. Simó-Alfonso E.F. Herrero-Martínez J.M. *Preparation of monolithic polymer-magnetite nanoparticle composites into poly(ethylene-co-tetrafluoroethylene) tubes for uses in micro-bore HPLC separation and extraction of phosphorylated compounds*. 2021. *Talanta* 224, 121806.
39. Torres-Cartas S, Meseguer-Lloret S., Catalá-Icardo M., Simó-Alfonso E.F. Herrero-Martínez J.M, *Aptamer-modified magnetic nanoparticles for extraction of atrazine in environmental water samples*. 2023. *Microchemical Journal* 191, 108902.

40. Torres Sánchez, M. Rendón Rojas, C.M. Santacruz Guerra, M. *Análisis de la toxicidad del Bisfenol A en la salud humana: Una aproximación conceptual*. 201).
[http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/2581/1/Analisis t
oxicidad Bisfenol A Biblioteca.pdf](http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/2581/1/Analisis_toxicidad_Bisfenol_A_Biblioteca.pdf). Fecha de consulta: 20/08/2023.
41. Tsalbouris, A., Kalogiouri N. P. Kabir, A., Furton Kenneth G., Samanidou, V. F., *Bisphenol A migration to alcoholic and non-alcoholic beverages – An improved molecular imprinted solid phase extraction method prior to detection with HPLC-DAD*. 2021. *Microchemical Journal*, Volume 162,105846.