

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

Grado en Ciencias Ambientales



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCOLA POLITÈCNICA
SUPERIOR DE GANDIA

**“DESARROLLO DE NUEVOS RELLENOS
MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE HIERRO
PARA LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE
COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS EN AGUA”**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autor/a:

DEBORAH ENGUIX MARTINEZ

Tutor/a:

SAGRARIO TORRES CARTAS

SUSANA MESEGUER LLORET

GANDIA, 2017

RESUMEN

En este proyecto se ha desarrollado una nueva fase estacionaria híbrida monolito-nanopartícula. Se trata de columna monolítica polimérica de metacrilato anclada sobre un tubo del fluoropolímero ETFE que ha sido modificada mediante la adición de nanopartículas (NPs) de magnetita (Fe_3O_4), lo que la hace adecuada para la separación de compuestos fosforados. El proceso de síntesis de la columna consiste en tres etapas: ataque de la pared interna del soporte para generar puntos de anclaje para el monolito; polimerización en el interior del tubo ETFE, y enlace de las NPs de magnetita al monolito. Se han estudiado dos protocolos de adición de las NPs al polímero. Con la columna híbrida polímero-NPs, se estudió la separación cromatográfica de tres fosfopéptidos: adenosín monofosfato, adenosín difosfato y adenosín trifosfato. Estos analitos de prueba se diferencian en el número de grupos fosfatos que poseen, lo que permiten comprobar la capacidad de retención de compuestos fosforados por parte del monolito modificado con NPs. La separación de los fosfopéptidos se ha obtenido con un gradiente de fase móvil, compuesta por acetonitrilo y una disolución de 10 mM tampón fosfato de pH 6.5. Con la columna monolítica de referencia no se obtiene la separación de los fosfopéptidos.

Palabras clave: HPLC, columnas monolíticas, nanopartículas, magnetita, fosfopéptidos.

ABSTRACT

In this project a new nanoparticle-modified monolithic stationary phase has been developed. It is a monolithic methacrylate polymer column anchored on an ETFE fluoropolymer tube. This polymer has been subsequently modified by the addition of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles (NPs), which makes the column suitable for the separation of phosphorus compounds. The synthesis process of the column consists of three steps: attack of the inner wall of the support to generate anchor points for the monolith; polymerization inside the ETFE tube, and bonding of the magnetite NPs to the monolith. Two NPs addition protocols were studied. Finally, the chromatographic behavior of the polymer-NPs hybrid column has been studied with three phosphopeptides: adenosine monophosphate, adenosine diphosphate and adenosine triphosphate. These test compounds differ in the number of phosphate groups, which allows the verification of the retention capacity of phosphate compounds by the NP-modified monolith. Phosphopeptides separation was obtained with a mobile phase composed of acetonitrile and a solution of 10 mM phosphate buffer pH 6.5 in gradient mode. With the reference monolithic column, no separation of phosphopeptides was obtained.

Keywords: HPLC, monolithic columns, nanoparticles, magnetite, phosphopeptides.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	3
1.1.1 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	4
1.2 COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS	6
1.1.2 COLUMNAS EMPAQUETADAS	6
1.1.3 COLUMNAS MONOLÍTICAS	7
1.1.4 CLASIFICACIÓN DE LAS COLUMNAS SEGÚN EL TAMAÑO DEL RELLENO	7
1.3 COLUMNAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS	8
1.3.1 SOPORTE DE LAS COLUMNAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS	8
1.3.2 POLIMERIZACIÓN	10
1.3.3 FUNCIONALIZACIÓN DEL POLÍMERO CON NANOPARTÍCULAS	13
1.4 FOSFOPÉPTIDOS	15
1.4.1 FOSFATOS DE ADENOSINA	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL Y REACTIVOS	17
3.1. INSTRUMENTOS Y APARATOS DE LABORATORIO	17
3.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES	18
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	18
4.1 ACTIVACIÓN DE LA PARED INTERNA DEL SOPORTE (TUBO ETFE)	19
4.2 POLIMERIZACIÓN	19
4.3 ADICIÓN DE NPs DE MAGNETITA AL POLÍMERO	22
4.3.1 ADICIÓN DE NPs MEDIANTE EL PROTOCOLO 1 (COLUMNAS R1 Y R2)	22
4.3.2. ADICIÓN DE NPs MEDIANTE EL PROTOCOLO 2 (COLUMNA R3)	23
4.4 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FOSFOPEPTIDOS	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1 ESTUDIO DE LA DISTANCIA A LA LÁMPARA Y TIEMPO DE REACCIÓN	26
5.2 PORCENTAJE DE GMA EN LA MEZCLA DE POLIMERIZACIÓN	26
5.3 FUNCIONALIZACIÓN DEL POLÍMERO CON NPs DE MAGNETITA	27
5.3.1 RESULTADOS DE LA FUNCIONALIZACIÓN DEL POLÍMERO CON LAS NPs SIGUIENDO EL PROTOCOLO 1. COLUMNA R1	27
5.3.2 RESULTADOS DE LA FUNCIONALIZACIÓN DEL POLÍMERO CON LAS NPs SIGUIENDO EL PROTOCOLO 1. COLUMNA R2	28
5.3.3 RESULTADOS DE LA FUNCIONALIZACIÓN DEL POLÍMERO CON LAS NPs SIGUIENDO EL PROTOCOLO 2. COLUMNA R3	28
5.4 SEPARACIÓN DE FPs	30
5.4.1 ESTUDIO DE LA ELECCIÓN DEL PH DE LA FASE MÓVIL	30
5.4.2 ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL ACN:TAMPÓN FOSFATO 10 MM DE PH 6.5	32
5.4.3 ESTUDIO DE GRADIENTE ÓPTIMO DE LA FASE MÓVIL ACN:TAMPÓN FOSFATO 10 MM PH 6.5	34
5.4.4 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LA COLUMNA DE REFERENCIA (R4)	37
6. CONCLUSIONES	39
7. BILIOGRAFIA	40

1. INTRODUCCIÓN

El trabajo que aquí se presenta se desarrolla en el marco de un proyecto de investigación desarrollado por el equipo de la Universidad de Valencia (CLECEM) y el de la UPV (QUIMAG). Existe, por tanto, experiencia en el trabajo cromatográfico y, concretamente en el desarrollo de nuevos materiales para los rellenos que se utilizan en las columnas cromatográficas.

A continuación, se exponen los puntos teóricos que dan soporte al trabajo experimental del proyecto.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas de análisis más ampliamente utilizada para resolver la composición de muestras complejas. Son muchos los campos de aplicación en los que se aplica para la separación de diferentes analitos, estas son algunas de sus aplicaciones:

- Farmacología: antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos...
- Bioquímica: aminoácidos, proteínas, glúcidos, lípidos, metabolitos...
- Alimentación: edulcorantes, antioxidantes, aditivos, aflatoxinas...
- Industria química: aromáticos, condensados, tensioactivos, propulsores, colorantes...
- Contaminantes: pesticidas, herbicidas, fenoles, PCB...
- Medicina clínica y forense: venenos, drogas, alcohol en sangre, extractos de orina, estrógenos...

Esta lista podría ampliarse en gran medida, ya que las técnicas cromatográficas se usan en todas las situaciones en las que el número de componentes de la muestra es elevado y se requiere aplicar separación para poder determinar su concentración.

En la última década se ha investigado el desarrollo de polímeros porosos como fases estacionarias en extracción en fase sólida (SPE, *solid phase extraction*), cromatografía líquida (HPLC) y electrocromatografía capilar (CEC). El interés por estos nuevos materiales se debe a su permeabilidad, versatilidad, bajo consumo de reactivos y fácil utilización en técnicas de separación. Sin embargo, su área superficial reducida y baja capacidad de carga han frenado el desarrollo de aplicaciones. El renovado interés actual de dichas fases se debe a la oportunidad que ofrece el maridaje con la nanotecnología. Las limitaciones de los monolitos poliméricos pueden mejorarse mediante el diseño de nuevos materiales híbridos que integren polímeros y NPs, lo que permite el desarrollo de materiales con propiedades más ajustadas a las necesidades específicas de cada muestra.

1.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (high performance liquid chromatography) es una técnica que permite separar los distintos componentes de una muestra y proporcionar la suficiente información para ser capaz de identificarlos cualitativamente y determinarlos cuantitativamente.

Esta separación se produce por un proceso de fijación selectiva y liberación que tiene lugar entre los componentes de la muestra a analizar y el relleno de la columna adsorbente (fase estacionaria), con un aporte continuo de líquido (fase móvil).

Los fundamentos de la separación cromatográfica son cuatro:

- La fase móvil y la fase estacionaria deben ser de polaridades opuestas.
- Los solutos han de ser totalmente solubles en la fase móvil (de igual polaridad).
- Todo soluto que entre en la columna ha de salir de ella (principio de propagación). Antes o después el soluto ha de salir de la columna disuelto en la fase móvil, a éste proceso se le denomina elución.
- Y, como objetivo, los solutos se han de separar entre sí (migración diferencial).

En la figura 1 se muestra una imagen en la que podemos ver la diferencia entre la propagación y la migración diferencial que se produce en una columna. Tal y como vemos en la figura, la propagación es el avance de la fase móvil a lo largo de la columna, arrastrando así a los solutos. Sin embargo, si existe interacción entre los solutos y la fase estacionaria, se produce un retraso en su avance, distinto para cada soluto (migración diferencial), que nos lleva a la separación de los componentes de la mezcla. Es decir, los solutos que interactúan con la fase estacionaria tienen mayor retención en la columna que aquellos con afinidad por la fase móvil.

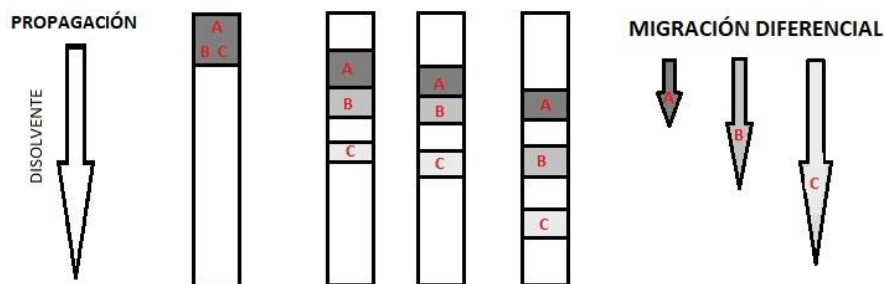


Figura 1. Esquema del proceso de migración diferencial en cromatografía.

En el proceso cromatográfico un conjunto de fuerzas compite de manera selectiva por un compuesto, tendiendo a fijarlo al relleno de la columna (fase estacionaria) o bien quedar disuelto en los líquidos (fase móvil) que fluyen a través de la columna, por lo que llamaremos a los compuestos a analizar solutos (De Marina Bayo, A. G., 2016). Hay distintas fuerzas que pueden actuar entre la fase estacionaria y la fase móvil:

- Fuerzas de reparto entre dos líquidos.
- Fuerzas de adsorción entre el líquido y el sólido.
- Fuerzas de intercambio iónico.
- Fuerzas de penetrabilidad en poros.

1.1.1 Tipos de cromatografía líquida

Hay diferentes tipos de cromatografía líquida, según los mecanismos por los cuales se produce la separación: cromatografía de reparto, de absorción, de intercambio iónico, de exclusión por tamaño y de afinidad.

1.1.1.1 Cromatografía de reparto

En la cromatografía de reparto se puede distinguir entre una cromatografía en la que el líquido que constituye la fase estacionaria es retenido por adsorción sobre el soporte

sólido, y una cromatografía en la que la fase estacionaria está químicamente unida al soporte. La separación se debe a la diferente distribución del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria:

- Cromatografía de reparto en *fase normal*: la fase móvil es un disolvente apolar o poco polar (como el hexano o el isopropiléter) y la fase estacionaria es un disolvente de elevada polaridad).
- Cromatografía de reparto en *fase inversa o reversa*: la fase móvil es un disolvente relativamente polar (disoluciones acuosas con etanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano) y la fase estacionaria es apolar, con grupo del tipo n-octilo, (C_8) o n-octadecilo (C_{18}).

En cromatografía en fase normal, el componente menos polar se eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil, y un aumento de la polaridad de la misma provoca una disminución del tiempo de elución. Por el contrario, en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución. (Gomis Yagües, V. 2008)

1.1.1.2 Cromatografía de adsorción

En la cromatografía de adsorción, la fase estacionaria es un sólido, y el analito queda retenido mediante fenómenos de adsorción. La fase estacionaria es habitualmente sílice. y los tiempos de retención se alargan a medida que la polaridad del analito aumenta.

La cromatografía de adsorción se emplea fundamentalmente para la separación de compuestos no polares de bajo peso molecular (Gomis Yagües, V. 2008).

1.1.1.3 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico o cromatografía iónica (IC) es una cromatografía líquida en la que como fase estacionaria se emplea una resina de intercambio iónico, de elevada masa molecular y esencialmente insoluble.

Los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de la muestra y los iones del mismo signo que se encuentran en la superficie de la resina. Dependiendo de las resinas que se utilicen podemos clasificarlas en:

- Las resinas de intercambio catiónico presentan grupos de ácido sulfónico (ácido fuerte) o grupos de ácido carboxílico (ácido débil).
- Las resinas de intercambio aniónico contienen grupos amino terciarios (muy básicos) o grupos amino primarios (bases débiles).

Las fases móviles empleadas suelen ser soluciones acuosas con cierta cantidad de algún disolvente orgánico miscible, como el metanol MeOH. El tipo y proporción de los disolventes en la fase móvil determinarán su fuerza y su selectividad.

La cromatografía de intercambio iónico se emplea tanto en la separación de especies inorgánicas como en la separación de compuestos orgánicos (Gomis Yagües, V. 2008).

1.1.1.4 Cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño o de gel es un tipo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria es un material poroso que permite la elución diferencial de los solutos en función de sus tamaños moleculares.

La cromatografía de exclusión por tamaño es utilizada en la separación de compuestos de elevado peso molecular como las proteínas, polímeros, ácidos grasos, glúcidos, sin embargo, no es aplicable a muestras con analitos de dimensiones similares. En general, se requiere una diferencia de 10 % en las masas moleculares para conseguir una resolución razonable (Gomis Yagües, V. 2008).

1.1.1.5 Cromatografía de afinidad

La cromatografía por afinidad es un tipo de cromatografía líquida que se basa en la unión reversible entre el analito de interés y un ligando específico, inmovilizado en un soporte sólido inerte. Cuando la muestra pasa por la columna, sólo son retenidas las moléculas que se unen de manera selectiva al ligando por afinidad, y las que no se unen avanzan con la fase móvil. Después, los analitos retenidos pueden ser arrastrados cambiando las condiciones de la fase móvil.

Las matrices o soportes empleados en cromatografía de afinidad como fase estacionaria deben ser rígidos, resistentes, insolubles, permeables y reactivos. Suelen ser de dos tipos: matrices de polisacáridos (agarosa, celulosa, dextrano) y matrices sintéticas (vidrio, poliacrilamida).

Los ligandos por afinidad característicos son anticuerpos, inhibidores de enzimas, o compuestos más generales, como las lecitinas (que se enlazan a polisacáridos). Se fijan mediante enlaces covalentes a la fase estacionaria químicamente activada.

La cromatografía por afinidad es muy específica y su mayor campo de aplicación se encuentra en la purificación o aislamiento de sustancias de naturaleza biológica, como proteínas o ácidos nucleicos (Gomis Yagües, V. 2008).

1.2 COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS

Las columnas cromatográficas están formadas por fases estacionarias situadas en el interior de un tubo, el cual puede ser de diferentes materiales y permite el trabajo a elevadas presiones. Para la incorporación de la columna en el sistema cromatográfico se emplean una serie de conectores.

En el caso de las columnas empaquetadas el relleno consiste en partículas porosas. En este caso es necesario el uso de sistemas que eviten la pérdida del relleno (fritas).

Existe otro tipo de columnas, denominadas monolíticas, en las que el relleno es un polímero de estructura continua que se genera directamente en el interior del tubo, ocupando todo su volumen y anclándose a las paredes del mismo, por lo que no es necesario el uso de fritas.

1.1.2 Columnas empaquetadas

Las columnas empaquetadas utilizadas en cromatografía en fase normal están formadas por pequeñas perlas de polímero de Sílice, una sustancia inerte que les

confiere el carácter polar característico de las fases estacionarias en este tipo de cromatografía de reparto.

Por otro lado, estas partículas de sílice pueden recubrirse con otro tipo de moléculas orgánicas que les confiera carácter apolar. De esta manera, se pueden utilizar como fase estacionaria en la cromatografía de fase inversa. La columna más ampliamente utilizada lleva unido a la sílice una cadena de carbono de octadecilo (C18), aunque existen otros grupos funcionales apolares también muy empleados, como una cadena n-octilo (C8), un grupo cinano (CN) o un grupo benceno.

1.1.3 Columnas monolíticas

En la actualidad se está desarrollando un nuevo tipo de columnas para cromatografía: las columnas monolíticas. Estas columnas no están formadas por un relleno de perlas empaquetadas, sino que la fase estacionaria se obtiene por polimerización de un monolito en el interior del tubo, obteniéndose un interior con múltiples canales por los que pueden pasar los compuestos químicos e interactuar con la fase estacionaria. Una de las ventajas de la preparación de estas columnas monolíticas poliméricas es que no necesitan de fritas para su sellado. Este tipo de columnas son una buena alternativa frente a las columnas empaquetadas convencionales ya que obligan a que la fase móvil atraviese toda la fase estacionaria obteniendo así unas propiedades específicas buscadas por los usuarios y obteniendo unos resultados de separación cromatográfica de buena calidad.

Las columnas monolíticas se pueden clasificar, básicamente, en dos categorías: de sílice y poliméricas.

Las columnas monolíticas de sílice consisten en una estructura de una sola pieza (monolito) formada por esqueletos interconectados que crean una distribución determinada de poros, macroporos y mesoporos. Los macroporos determinan el flujo máximo admisible por la columna, mientras que en los mesoporos es donde se realizan los procesos de adsorción y retención de los solutos.

Una columna monolítica de sílice se puede modificar químicamente según las necesidades requeridas por el usuario y dotarla de la funcionalidad requerida, añadiéndole, por ejemplo, grupos C8, C18 o CN (Oscar Núñez, 2008).

Las columnas monolíticas poliméricas se desarrollan con mayor detalle en el siguiente apartado.

1.1.4 Clasificación de las columnas según el tamaño del relleno

Las fases estacionarias en HPLC se encuentran en el interior de un tubo de acero, en el caso de columnas convencionales y microcolumnas, mientras que para las columnas capilares y nanocolumnas se utiliza un tubo de sílice recubierto con otro polímero como soporte de la fase estacionaria.

En la tabla 1 se muestra una clasificación de las columnas, junto con su diámetro interno, longitud, tamaño de partícula y el caudal de la fase móvil. Las columnas preparativas y semipreparativas se utilizan para la purificación de los compuestos, y el resto de columnas que aparecen en la tabla se utilizan con fines analíticos.

Tabla 1. Clasificación de las columnas cromatográficas según su tamaño de diámetro interno. Fuente bibliográfica: Catalogo Teknokroma®, agosto-2017

Tipo	Diámetro interno (mm)	Longitud (cm)	Tamaño partícula (µm)	Flujo (mL/min)
Preparativa	10-50	10-30	5-20	10-50
Semipreparativa	5-10	10-30	5-20	2-10
Analítica	3-5	2-30	>2-10	0,5-2
Micro	0,5-3	15-25	>2-8	0,05-0,5
Capilar	0,15-0,5	5-15	>2-5	10^{-3} - 10^{-2}
Nano	0,01-0,15	5-15	>2-5	10^{-5} - 10^{-3}

Las diferencias en el d.i. y longitudes de las columnas vienen dados por las necesidades que se requieran para cada análisis. Así, por ejemplo, para la determinación de digestos de proteínas y péptidos, una columna de 150 mm de longitud (LC-convencional) tarda una media de 20-30 min para su análisis. Si se desea acortar el tiempo de análisis se puede reducir utilizar columnas con partículas más pequeñas (Silva, R., 2011).

1.3 COLUMNAS MONOLÍTICAS POLIMÉRICAS

Las columnas monolíticas poliméricas se obtienen mediante la polimerización de una mezcla de monómeros en el interior de un tubo.

La mezcla de polimerización es el resultado de combinar monómeros, un agente entrelazante (cross-linker), uno o varios porógenos y un iniciador radicalario. El control sobre el proceso de polimerización nos permite optimizar las propiedades porosas de los monolitos.

Por otro lado, este monolito puede ser funcionalizado mediante la unión de diferentes tipos de nanopartículas que permite su utilización para separaciones más selectivas, es decir, obtener, la columna con las interacciones adecuadas para conseguir la mejor separación cromatográfica en cada caso.

Además, con el fin de evitar que la fase móvil arrastre con ella el lecho poroso (el monolito polimérico), se necesita un buen anclaje del polímero a la pared interna del capilar. Para ello se ha de pretratar la pared del soporte con los reactivos adecuados (Oscar Núñez, 2008).

1.3.1 Soporte de las columnas monolíticas poliméricas

Los soportes que se han empleado habitualmente para este tipo de columnas son capilares de sílice, que hacen posible el uso de columnas monolíticas en técnicas cromatográficas como electrocromatografía (CEC) y HPLC capilar. Sin embargo, la adaptación a otros tipos de cromatografía como la convencional, requiere de soportes de diámetro interno superior que permitan utilizar flujos más elevados. Por eso, recientemente se han empezado a usar como soportes tubos de PEEK o

fluoropolímeros (PTFE, FEP, ETFE). En la tabla 2 se muestra la estructura de estos polímeros.

El PEEK (Polyether ether ketone) es un material polimérico inerte, biocompatible y resistente a altas presiones. Resiste cualquier pH y temperatura, sólo es atacado por algunos disolventes orgánicos apolares como el cloroformo, cloruro de metileno, dimetilsulfóxido, y por el ácido sulfúrico y el nítrico a elevadas concentraciones. Existen tubos PEEK con diámetro interno entre 0.0635 mm y 0.762 mm.

El PTFE (politetrafluoroetileno), más comúnmente conocido como teflón, es utilizado para tubos a baja presión y posee una gran resistencia química; alcanza mucha más estabilidad si se recubre de fibra de vidrio.

El FEP (fluoroetilénpropileno) posee propiedades similares al teflón, aunque FEP es más rígido, es menos transparente, y se moldea peor.

El ETFE (etiltrifluoroetileno), más conocido como Tefzel, es un tipo de polímero termoplástico resistente a los ácidos, bases, y disolventes comunes para HPLC y tolera temperaturas de hasta 200°C (De Marina Bayo, A. 2006).

Tabla 2. Estructura de los polímeros que se utilizan como soporte en la síntesis de columnas monolíticas poliméricas.

Nombre el polímero	Estructura del polímero (monómero)
PEEK Polyether ether ketone	
PTFE Politetrafluoretileno	
FEP Fluoroetilénpropileno	
ETFE Etiltrifluoroetileno	

Puesto que se trata de materiales poco reactivos, se necesita realizar un tratamiento agresivo sobre la pared interna del tubo para anclar el monolito y evitar la pérdida de la fase estacionaria con el eluyente.

En el trabajo realizado, se ha usado fluoropolímeros como soporte (Oscar Núñez, 2008).

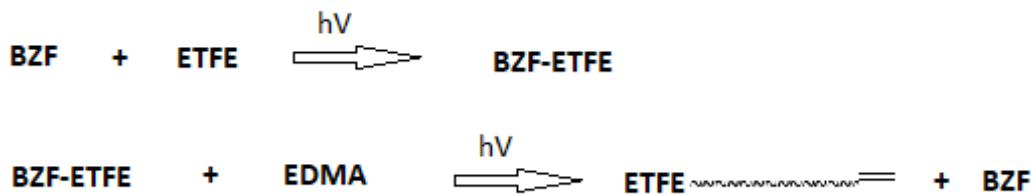
1.3.1.1. Activación de la pared interna del soporte

Con el fin de evitar que la fase móvil arrastre con ella el lecho poroso (el monolito polimérico) se necesita un buen anclaje del polímero a la pared interna del capilar, es decir, que no exista ningún espacio intersticial entre la pared de la columna y el lecho. Para ello, la pared interna del tubo se ha de tratar antes de realizar la polimerización del monolito en su interior

Existen diferentes formas de atacar la pared interna del tubo de teflón, para generar los puntos de anclaje suficientes para la posterior unión del polímero sobre ellos:

- Ataque a temperatura ambiente y en atmosfera de N_2 mediante el reactivo comercial Fluoroetch®, que generará en la pared del teflón grupos reactivos del tipo hidroxilo (OH).
- Ataque térmico con una mezcla de agua oxigenada y ácido sulfúrico concentrado 1:1 a $60^\circ C$, que generará en la pared del teflón grupos reactivos del tipo hidroxilo (OH).
- Ataque con Benzofenona (BZF) y EDMA (3,4-Ethylenedioxy-N-methylamphetamine) en presencia de luz ultravioleta (fotografting), que generará en la pared del teflón grupos reactivos del tipo doble enlace.

A continuación, mostramos un esquema de la reacción de creación de los dobles enlaces de la pared del ETFE que posteriormente se unirán a los monómeros durante el proceso de polimerización.



1.3.2 Polimerización

1.3.2.1 Mezcla de polimerización

Para preparar la mezcla de polimerización se debe seleccionar los monómeros, el agente entrelazante, los porógenos y el iniciador radicalario. A continuación, se van a describir cada uno de los componentes de la mezcla.

Monómeros

Los monómeros son pequeñas moléculas orgánicas que forman la unidad mínima de las macromoléculas. Puede ser el mismo monómero repetido o diferentes monómeros los que unan entre ellos, mediante enlaces químicos (enlaces covalentes) formando estructuras más complejas (macromoléculas) llamados polímeros.

El monómero más común en la naturaleza es la glucosa, que mediante enlaces glicosídicos forma polímeros como el almidón y la celulosa, compuestos que forman la mayoría de la estructura seca de las plantas. Otro ejemplo serían los aminoácidos, los monómeros de las proteínas.

Una de las características que determina las propiedades del polímero es como se unen entre si los monómeros que la componen y su longitud, ya que se sabe que al aumentar la longitud de la cadena que forman el polímero se pierden movilidad, aumentando así su rigidez y dureza.

Existe una gran variedad de monómeros, y su elección depende de las propiedades que se desea que tenga el polímero formado, tales como ácido acrílico, ácido metacrilato, glicidilmetacrilato, N-metiloacrilamina, estireno sulfonato de sodio (Cantó Mirapeix, M. D. 2009).

En el caso de la preparación de columnas monolíticas, los monómeros más utilizados son los ésteres de acrilato ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COO}-\text{R}$) y de metacrilato ($\text{CH}_2=\text{C}-(\text{CH}_3)-\text{COO}-\text{R}$), que permiten modificar la polaridad en función de la naturaleza del sustituyente R. Éstos ester de metacrilato son utilizados porque permiten la preparación de los monolitos con diferentes polaridades en función de la naturaleza de los sustituyentes (R). Los ester de metacrilato más utilizados son el *butilmetacrilato* (BMA), el *metacrilato de estearilo* (HMA), el *metacrilato de laurilo* (LMA). (Cantó Mirapeix, M. D. 2009) Los monolitos basados en ésteres de metacrilato presentan buena estabilidad en las separaciones usando fases móviles de pH básico (Nordborg, A. 2009).

Agente entrelazante (*cross-linker*)

Tal y como nos indica el nombre, la función del agente entrelazante es unir los monómeros entre sí e incrementar la longitud de la cadena polimérica, formando redes poliméricas. En la figura 2 se muestra, cómo se produce la unión de los monómeros, a través de su radical libre, con los dobles enlaces del agente entrelazante.

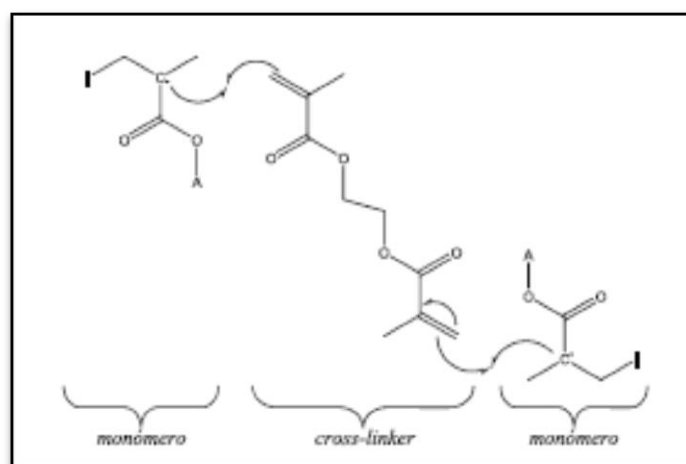


Figura 2. Reacción entre los monómeros y el agente entrelazante.

Fuente bibliográfica: Cantó Mirapeix, M. D. 2009

Los agentes entrelazantes más utilizados para columnas de ésteres de metacrilato son el *dimetacrilato de etilenglicol* (EDMA) y el *divinilbenceno* (DVB). Sin embargo, para las columnas con ésteres de acrilato el entrecruzante más común es el *1,3-butanidol* (BDDA).

Hay que tener en cuenta que un cambio en el porcentaje de entrecruzante en la mezcla polimérica puede afectar a las propiedades del lecho monolítico. Así, un aumento de éste produce una disminución del tamaño de los poros, afectando así a la rigidez y a la permeabilidad de los monolitos a los líquidos. (Cantó Mirapeix, M. 2009)

Porógenos

La disolución de porógenos es una mezcla de compuestos presentes en la polimerización que tiene como función permitir la mezcla homogénea de los monómeros usados, incluso con distintas polaridades, y el agente entrelazante. Los restos de porógenos se eliminan de la columna polimerizada mediante un lavado inicial de la columna.

Controlar el porcentaje de porógenos nos ayuda a trabajar a diferentes presiones. Así, por ejemplo, si los poros obtenidos son grandes, la columna no presentará tanta resistencia al paso de la fase móvil (presiones bajas) y dará lugar a separaciones rápidas. Por el contrario, si disminuimos el tamaño del poro, aumentamos la resistencia al flujo de paso de la fase móvil y, por tanto, aumentará la presión de trabajo que la columna deberá soportar; en estos casos también disminuirá la anchura de los picos obtenidos y aumentará el tiempo de retención de los analitos (Cantó Mirapeix, M. 2009).

Iniciador radicalario

Los iniciadores son sustancias que provocan el comienzo de la reacción de polimerización. Sin embargo, para que puedan cumplir esa función, es necesario el uso agente complementario: temperatura, luz ultravioleta o un compuesto químico.

Si hablamos de la termoiniciación, el proceso de polimerización se activa mediante el aumento de la temperatura, por ejemplo, a una temperatura de 60-70°C. Hay que tener claro cuál es la tolerancia de la reacción de polimerización frente a la temperatura, ya que, si la temperatura es más elevada de lo que debería, el tiempo de reacción disminuirá, pero se creará un polímero con estructuras porosas menos uniformes, mientras que a bajas temperaturas se pueden inhibir el efecto del iniciador.

Algunos de los iniciadores térmicos más usados son el AIBN (*α,α' -azobisisobutironitrilo*), el LPO (*peróxido de laurilo*) o el BPO (*peróxido de benzoilo*).

En la fotoiniciación, el comienzo de la reacción se activa mediante radiación UV en el interior de una cámara UV. Se ha de ajustar la intensidad y frecuencia de la radiación, así como la distancia a la cual está situada la columna respecto a la fuente de radiación. Modificando estos parámetros se influye sobre el tiempo necesario para la reacción de polimerización. En este tipo de iniciación radicalaria la columna que contiene la mezcla polimérica debe ser transparente a la radiación UV, para que así la radiación sea efectiva.

Los iniciadores más utilizados con este método de iniciación de la polimerización son el AIBN y el DMDA (2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenona).

Finalmente, una iniciación mediante agentes químicos emplea compuestos que aceleran la producción de radicales libres. El iniciador químico más común es el

peroxidisulfato junto con el TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina), para activar el iniciador.

Los métodos de iniciación polimérica más comúnmente utilizados son la termoiniciación y fotoiniciación (Cantó Mirapeix, M. 2009).

1.3.2.2 Reacción de polimerización

El proceso de polimerización se descompone en dos reacciones principales. En la primera reacción el iniciador se descompone generando radicales libres y en la segunda reacción el monómero reacciona con los radicales libres generados por el iniciador y también con el agente entrecruzante (cross-linker), provocando así el crecimiento de la cadena polimérica. El resultado final de la reacción de polimerización es la obtención de un sólido monolítico (polímero) y un líquido inerte que rellena los poros y que es eliminado posteriormente con el lavado de la columna.

Teniendo en cuenta que las propiedades cromatográficas de la columna vienen determinadas por la naturaleza de los monómeros y porógenos, y la concentración del iniciador, para nuestros experimentos utilizaremos *glicidil metacrilato* (GMA) como monómero, *divinilbenceno* (DVB) como cross-linker, 1-decanol y tetrahidrofurano como disolventes porogénicos, y LPO como iniciador radicalario térmico.

El iniciador térmico, LPO, por acción del aumento de la temperatura a 70°C formará radicales libres que se unirán al monómero GMA y, a su vez, a los dobles enlaces de la pared interna de la columna de ETFE, creados durante el pretratamiento de la pared del teflón. Una vez unidos los dobles enlaces de la pared del teflón a los monómeros, se irán enlazando monómeros entre ellos formando cadenas, que se unirán entre sí mediante el agente entrelazante, DVB (Nordborg, A. 2009).

1.3.3 Funcionalización del polímero con nanopartículas

La funcionalización del monolito con nanopartículas confiere al polímero propiedades mejoradas, aumentando la superficie de contacto y aporta selectividad a las interacciones con los analitos.

Las nanopartículas (NPs) son partículas microscópicas, miden menos de 100 nanómetros. Tienen una alta superficie específica por unidad de volumen, lo que favorece las reacciones.

Las propiedades de las NPs dependen de su forma, tamaño, superficie, y estructura interna e incluso de la presencia de otras sustancias

Dependiendo de su naturaleza, las NPs poseen propiedades magnéticas, eléctricas, ópticas, catalíticas, bio-reconocimiento y biocidas. Por ejemplo, las nano partículas metálicas aumentan la facilidad de conducción de electrones o alteran las propiedades ópticas. En el área del bio-reconocimiento, el uso de nanopartículas ha permitido el diseño de ensayos inmunodiagnósticos. (Mahouche-Chergui, S. 2013)

Las NPs se utilizan ya en campos muy diversos. Algunos ejemplos de las aplicaciones se describen a continuación.

Medicina.

Cremas con NPs de Ag debido a sus propiedades biocidas para tratar las infecciones contra 150 tipos de bacterias. Se utilizan, por ejemplo, para el tratamiento de quemaduras en la piel o heridas crónicas.

Adhesivos dentales con NPs de Si para la formación de uniones más fuertes con el esmalte que se utilizan en endodoncias. Un ejemplo es el *Adper Singles Bond Plus Adhesive*.

Higiene y cuidados personales.

Uso de NPs de Ag en la industria textil, en la elaboración de calcetines y otras prendas de vestir, para prevenir infecciones como el pie de atleta u otras infecciones.

También se emplean nanoemulsiones en desinfectantes utilizado en aviones militares para combatir el problema de la SARS (Síndrome respiratorio agudo-severo)

Uso doméstico.

El recubrimiento con repelente de suciedad a base de NPs hidrofóbicas, creado, por BASF® se emplea en ladrillos, yesos, la industria textil y automotora.

Deportes.

En la mejora de las propiedades de materiales como las pelotas de tenis incrementando por ejemplo su duración. (Wing, C. 2006)

Dada la gran variedad de NPs y sus propiedades, en los últimos años se han realizado investigaciones sobre el enlace de NPs sobre soportes poliméricos. Puesto que las cadenas de polímero son flexibles y pueden contener una gran variedad de grupos funcionales, son capaces de inmovilizar nanopartículas sobre ellas de forma eficaz mediante enlaces dispersivos o van der Waals, electrostáticos, enlaces por puente de hidrógeno o enlaces covalentes.

La combinación de polímeros de diferente naturaleza, forma, estructura química y propiedades físicas con diferentes tipos de nanopartículas nos permite diseñar infinidad de sistemas en función de las aplicaciones requeridas. Los materiales híbridos así obtenidos pueden tener prestaciones muy interesantes en el campo de la Química Analítica.

Centrándonos en el trabajo que aquí se presenta, hay que decir que en la modificación de columnas monolíticas, las NPs más ampliamente utilizadas son las NPs metálicas, como las de plata y de oro, y las NPs de óxidos, como las de óxido de hierro, dentro de las cuales se encuentran las NPs de magnetita (Krenkova, J., 2011) (Ríos, A., 2013).

1.3.3.1 Funcionalización con NPs de óxido de hierro

Para poder funcionalizar la columna monolítica polimérica con las NPs de óxido de hierro puede procederse de dos formas diferentes, utilizando como reactivo el APTMS [(3-aminopropil)-trimetoxisilane], un aminosilano utilizado en procesos de silanización para funcionalizar sustratos.

Un procedimiento consiste en hacer reaccionar el polímero con una disolución de APTMS en acetona. Cuando este compuesto se pone en contacto con la columna monolítica polimérica, el grupo amino reacciona con el polímero, quedando así la columna funcionalizada con grupos alcoxilano (figura 3). Posteriormente, se hace reaccionar los grupos alquilsilano con las NPs de óxido de hierro.

El otro procedimiento consiste en hacer reaccionar las NPs de óxido de hierro con una disolución de APTMS en acetona. Cuando este compuesto se pone en contacto con las NPs, los grupos alquilsilano del reactivo reaccionan con el hierro, quedando así las funcionalizadas con grupos amino (figura X). Posteriormente, se hace reaccionar los grupos amino de las NPs con el polímero de la columna monolítica (Lu, A. 2007).

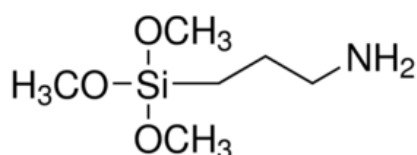


Figura 3. Estructura del APTMS.

1.4 FOSFOPÉPTIDOS

Los péptidos son un grupo de biomoléculas formadas por aminoácidos que se unen mediante enlaces peptídicos. Los péptidos, al igual que las proteínas, están presentes en la naturaleza y son responsables de muchas de las funciones de los seres vivos. Se considera proteína a la unión de más de 100 aminoácidos, mientras que la unión de una cantidad inferior se denomina péptido.

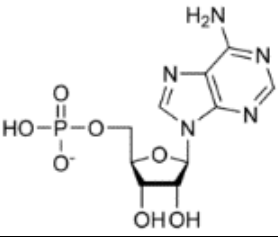
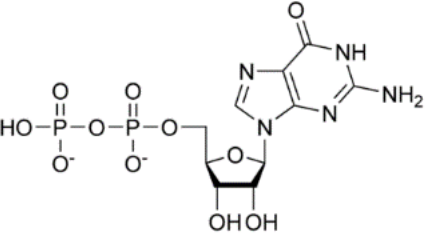
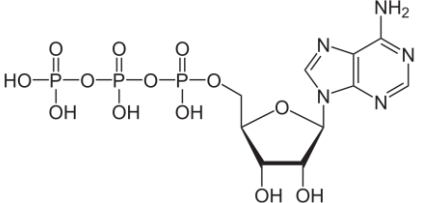
Un fosfopéptido (FP) es cualquier péptido que contiene uno o más grupos fosfato, como resultado del proceso de fosforilación. Los grupos fosfatos están fuertemente enlazados y se hidrolizan fácilmente; al romper los enlaces obtenemos una gran cantidad de energía que sirve para impulsar otras reacciones (Pei Jin Xie, 2011).

1.4.1 Fosfatos de adenosina

Los fosfopéptidos (FPs) con los que se trabaja en este estudio son fosfatos de adenosina: el AMP, *adenosin-5'-monofosfato*, el ADP, *adenosin-5'-difosfato* y el ATP, *adenosin-5'-trifosfato*.

Las estructuras de estos tres fosfopéptidos de adenosina se muestran en la tabla 3. Como podemos ver, todas las moléculas fosfopeptídicas poseen la misma estructura principal, un azúcar llamado ribosa y un grupo adenina; lo que varía es el número de grupos fosfatos dando lugar así a las diferentes estructuras fosfopeptídicas: AMP tiene un grupo fosfato, el ADP dos grupos fosfatos y el ATP tres grupos.

Tabla 3. Estructura química del AMP, ADP y ATP.

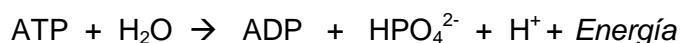
Nombre del compuesto	Estructura
Adenosin monofosfato (AMP)	
Adenosin difosfato (ADP)	
Adenosin trifosfato (ATP)	

El ADP y el ATP son las moléculas encargadas de transferir la energía desde las reacciones en las que se libera energía a partir de la degradación de los nutrientes (reacciones exergónicas) a las reacciones que absorben energía para las funciones de la célula (reacciones endergónicas). Así, la energía liberada en la oxidación de los alimentos es absorbida por el ADP, que se transforma en ATP. Este proceso que se denomina fosforilación y es el mecanismo básico de transporte de la energía desde donde se genera hasta donde se necesita. Estos procesos de transferencia son necesarios ya que proporcionan la energía necesaria para las actividades de la vida (Pei Jin Xie, 2011).

En la fosforilación del ADP, se adiciona un grupo fosfato (P) gracias a la absorción de energía, y éste compuesto se transforma en ATP, liberándose una molécula de agua:



La reacción contraria a la fosforilación es la *hidrólisis* del ATP a ADP. El ATP es una molécula muy inestable y, en presencia de agua, se hidroliza muy fácilmente, dando como productos de reacción el ADP, el anión monohidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) y un protón (H^+), además de liberarse gran cantidad de energía (Eduardo Ghershman, 2015):



1.4.1.1 Métodos de análisis más comunes

Los fosfatos de adenosina son extremadamente polares debido a la presencia de los grupos fosfatos y se trata compuestos difíciles de separar y determinar, por la similitud de sus estructuras (Pei Jin Xie, 2011).

El método más común empleado para analizar y determinar fosfopéptidos es la cromatografía de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico. También se ha utilizado otros métodos cromatográficos como, por ejemplo, cromatografía líquida en fase reversa. Así, se ha utilizado la espectrometría de masas (MS) con HPLC para la determinación de la concentración de AMP, ADP y ATP en muestras biológicas de orina, sangre y tejidos (Pei Jin Xie, 2011) (De Marina Bayo, A. G., 2016).

Por otra parte, la electroforesis capilar, otra técnica separativa, se ha utilizado para mejorar la resolución en la separación de los fosfatos de adenosina en las muestras biológicas (Blog Enrique Castaños).

En este trabajo se han seleccionado los tres fosfatos de adenosina (AMP, ADP, y el ATP) para poder comprobar las propiedades de retención de las columnas monolíticas poliméricas modificadas con NPs de óxido de hierro. El hierro es un metal que forma complejos muy estables con el fósforo (P). Por ello, se han seleccionado estos tres compuestos que se diferencian en el número de átomos de fósforo en su estructura, para comprobar que las interacciones mayoritarias cuando se utilizan estas columnas en un sistema cromatográfico son debidas a las interacciones entre el Fe y el P, es decir, a la presencia de las NPs en la columna.

2. OBJETIVOS

Los principales **objetivos** de la tarea propuesta son:

- Obtener nuevos rellenos poliméricos sobre tubos de teflón para su empleo en sistemas cromatográficos.
- Estudiar la viabilidad de que estos nuevos materiales se puedan funcionalizar con nanopartículas (NPs) de hierro.
- Aplicar los rellenos sintetizados en la determinación de fosfopéptidos, optimizando la fase móvil para su separación.

3. MATERIAL Y REACTIVOS

3.1. INSTRUMENTOS Y APARATOS DE LABORATORIO

Para llevar a cabo la parte experimental se han empleado los siguientes aparatos e instrumentos de laboratorio:

- Cromatógrafo Jasco 4100 (Jasco, Easton, MD, USA). Equipado con bomba cuaternaria de gradientes, sistema automuestreador, horno de columna y detector UV-vis de fila de diodos
- Bombas de jeringa
- Baño de ultrasonidos
- Horno
- Lámpara UV

3.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Todos los reactivos empleados son de grado analítico o superior. Todas las disoluciones acuosas se han preparado con agua MiliQ. A continuación, se incluye la lista de los compuestos químicos usados:

- Acetona
- Acetonitrilo (ACN)
- 3-Aminopropil) trimethoxisilano (APTMS)
- Amoniacó NH₃ 32%
- Benzofenona (BZF)
- 1-Decanol
- Dimetacrilato de etilenglicol (EDMA)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Divinilbenceno (DVB)
- Etanol absoluto (EtOH)
- Fosfopéptidos: AMP, ADP 95% y ATP 99%
- Glicidil metacrilato (GMA)
- Lauril peróxido LPO 97%
- Metanol (MeOH) absoluto y de lavado (50% agua)
- N₂ (gas)
- NPs de magnetita (Fe₃O₄)
- Tampón acetato 8 mM pH=5
- Tampón fosfato 10 mM pH=6.5 y pH=8
- Tetrahidrofurano (THF)

Además, se ha utilizado tubo del fluoropolímero ETFE de 0.5 mm de diámetro interno

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Como se ha dicho en los objetivos del proyecto, se pretende estudiar la posibilidad de preparar una nueva columna monolítica polimérica modificada con NPs de magnetita en soporte de teflón, comprobar su viabilidad hidrodinámica y aplicabilidad como columna cromatográfica, ensayando la separación de tres fosfatos de adenosina.

En primer lugar, se describirá el procedimiento experimental seguido para la preparación de la columna polimérica modificada con magnetita. Se detallarán los aspectos metodológicos relacionados con cada una de las tres etapas de preparación de las columnas (activación de la pared interna, polimerización y adición de NPs) mediante los dos procedimientos seguidas:

Procedimiento 1:

1. Activación de la pared interna del soporte (tubo ETFE)
2. Polimerización
3. Adición de las NPs de magnetita al polímero (Protocolo 1)
 - a. Silanización del polímero con APTMS
 - b. Reacción de las nanopartículas de magnetita con el polímero silanizado

Procedimiento 2:

1. Activación de la pared interna del soporte (tubo ETFE)
2. Polimerización
3. Adición de las NPs de magnetita al polímero (Protocolo 2)
 - a. Aminación de las nanopartículas de magnetita con APTMS
 - b. Reacción de las nanopartículas de magnetita aminadas con el polímero

Las etapas 1 y 2 son iguales en ambos procedimientos, mientras que la etapa 3 se ha llevado a cabo mediante 2 protocolos diferentes. A continuación, se detalla el procedimiento experimental para las diferentes etapas

4.1 ACTIVACIÓN DE LA PARED INTERNA DEL SOPORTE (TUBO ETFE)

Se van a preparar cuatro columnas que finalmente tendrán una longitud de 10 cm.

La columna polimérica modificada con NPs de magnetita se prepara utilizando tubo de teflón tipo ETFE de 0.5 mm de diámetro interno como soporte.

El ETFE es un material inerte, por lo que la superficie interna del tubo requiere de una modificación para añadir grupos reactivos que puedan enlazarse con el polímero.

La activación del tubo ETFE se ha realizado mediante “fotografting” con benzofenona y *dimetacrilato de etilenglicol* (EDMA) en presencia de luz UV siguiendo el siguiente protocolo:

- Cortar 32 cm del tubo de ETFE y lavarlo con 1.5 mL de EtOH, y 1.5 mL de acetona. Secarlo con N₂ durante 10 minutos.
- Preparar una disolución de *benzofenona* 5% en MeOH.
- Cortar el tubo ya seco con la guillotina en 2 porciones de 16 cm cada una, y ponerles los ‘fittings’.
- Pasar a través de las dos columnas 1,5 mL de la disolución de BZF preparada a un flujo de 0,1 mL/min con una bomba de inyección
- Introducir las columnas en la cámara UV e irradiarlas durante 30 min a $\lambda=254$ nm.
- Preparar una disolución de EDMA a 15% en MeOH
- Hacer pasar 1.5mL de esta disolución a través de las columnas con un flujo de 0,1 mL/min.
- Introducir nuevamente las columnas en la cámara UV e irradiarlas a la misma longitud de onda durante otros 30 min.

Finalmente, lavamos las columnas con MeOH, las secamos con N₂ y las guardamos cerradas hasta que esté lista la mezcla de polimerización y las rellenamos con ella.

4.2 POLIMERIZACIÓN

Tras la activación del soporte, se lleva a cabo la etapa de polimerización.

En primer lugar, se prepara en un vial de vidrio la mezcla de polimerización, que consiste en: el monómero *glicidil metacrilato* (GMA), el cross-linker *divinilbenceno* (DVB), dos disolventes porogénicos, el *1-decanol* y el *tetrahidrofurano* (THF), y el

iniciador *lauril peróxido* (LPO), un iniciador térmico. La polimerización se realizará por termoiniciación en horno a 60°C.

Nuestra mezcla de polimerización posee un 40% del monómero GMA y un 60% del agente entrelazante DVB. En la tabla 4, mostramos los valores teóricos de cada uno de los componentes de la mezcla, así como el porcentaje que representan sobre la masa final.

Tabla 4. Masa teórica de los componentes de la mezcla de polimerización el % que representa cada componente sobre la mezcla.

Componentes	Masa (g)	% (w/w)
GMA	0,6667 g	13,33%
DVB	1,0000 g	20,00%
1-decanol	3,0333 g	60,67%
THF	0,3000 g	6,00%
LPO	0,0500 g	1,00%
<i>TOTAL</i>	<i>5,0000 g</i>	<i>100%</i>

Para preparar la mezcla de polimerización, se pesa primero el iniciador LPO, después los monómeros de menor a mayor peso, primero el GMA y después el DVB, y finalmente se pesarán los disolventes porogénicos de menor a mayor peso, primero el THF y después el 1-decanol. Los componentes de la mezcla se pesan utilizando una balanza analítica y dentro de la campana extractora ya que los vapores son tóxicos.

La mezcla de polimerización se introduce en el baño de ultrasonidos durante 3 minutos y, posteriormente, se le pasa N₂ durante 10 minutos.

A continuación, se rellenará el tubo ETFE activado con la mezcla de polimerización. Para ello, se seguirán los siguientes pasos:

- Cortar un cuentagotas de plástico, quedándonos solo con la parte del tubo y desechando la parte superior (perilla).
- Con un mechero cerrar la parte inferior del tubo del cuentagotas e introducir dentro la columna.
- Rellenar una jeringa con aguja con la mezcla polimérica e introducirla en la columna con especial precaución de no crear ninguna burbuja, ya que ahí no se produciría la polimerización y habría que desechar la columna (figura 4). Continuar añadiendo mezcla hasta que ésta quede por dentro y por fuera del tubo ETFE activado y cerrar el cuentagotas con una masilla adhesiva (Blu-Tack).
- Situar las columnas en posición vertical en el horno a 70° durante 4h (figura 5).

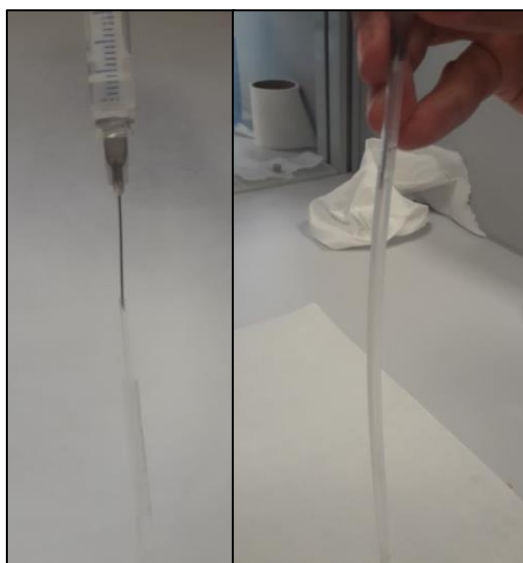


Figura 4. Inyección del polímero dentro de la columna



Figura 5. Columna en posición vertical en el horno para la polimerización.

Tras la polimerización, se sacan las columnas del interior de los tubos que las contiene. Para ello, con un cúter y con mucho cuidado se saca la columna y se desecha el polímero que rodea al tubo de ETFE. La columna se lava con MeOH impulsándolo con la bomba del equipo cromatográfico para eliminar cualquier resto de disolvente o porógenos que hayan quedado relleno los poros de la columna después de la polimerización. El flujo de lavado inicial es de 0.01 mL/min, y éste se va aumentando muy poco a poco hasta llegar a 0.5 mL/min para evitar que se rompa la columna preparada. Entonces, se mantiene el lavado durante 30 minutos.

Tras el lavado, cerramos las columnas, las etiquetamos y las guardamos a temperatura ambiente. Se han preparado cuatro columnas con una longitud final de 10 cm, nombradas como R1, R2, R3 y R4. Las columnas R1, R2 y R3 se tratarán mediante diferentes protocolos, mientras que la columna R4 será nuestra columna de referencia.

4.3 ADICIÓN DE NPs DE MAGNETITA AL POLÍMERO

La adición de NPs de magnetita al polímero se ha realizado mediante dos protocolos distintos.

El Protocolo 1 se aplica a las columnas R1 y R2: las columnas se tratan con APTMS y, posteriormente, se le añaden las NPs de Fe. En la columna R1 el APTMS está disuelto en acetona, mientras que en la columna R2 el reactivo se prepara en DMSO.

Para la columna R3 la adición de NPs de magnetita al polímero se realizará mediante el Protocolo 2, en el que se altera el orden de enlace entre los reactivos. En primer lugar, se tratan las NPs de Fe con APTMS, y posteriormente, se adición las NPs aminadas al polímero.

Ambos protocolos de adición de NPs se explican con más detalle en el siguiente apartado.

4.3.1 Adición de NPs mediante el protocolo 1 (columnas R1 y R2)

La funcionalización con nanopartículas de magnetita de las columnas R1 y R2 se llevó a cabo utilizando nanopartículas fabricadas por el grupo de investigación.

Las dos etapas del protocolo son las siguientes:

1. Silanización del polímero con APTMS. La columna R1 se rellenó con APTMS al 11% preparado en acetona y la columna R2 con APTMS al 11% preparado en dimetilsulfóxido (DMSO). Ambas columnas se mantuvieron 3h en el horno a 60°C
2. Reacción de las nanopartículas de magnetita con el polímero silanizado. Para adicionar las nanopartículas se siguieron estos pasos
 - Se prepararon dos dispersiones de 50 ppm de NPs de magnetita con la ayuda de ultrasonidos (20 minutos). Para tratar la columna R1 la dispersión se realizó en una disolución de EtOH 50% y citrato 1.5%, y para la columna R2 en DMSO.
 - Se hizo pasar en ambos casos la dispersión de NPs mediante la bomba del HPLC a un flujo de 0.05 mL/min. Para ello, se utilizó el montaje que se muestra en la figura 6. El 'loop' se llenaba con la dispersión de NPs (unos 3 mL), reponiendo la disolución del loop periódicamente para asegurar el paso continuo de NPs por la columna. El tratamiento se prolongó durante 6 horas. La fase móvil era una disolución de EtOH 50% para la columna R1 y DMSO para la columna R2.
 - Para finalizar el proceso, se hizo pasar a través de cada columna la fase móvil correspondiente durante 30 min a un flujo de 0.05 mL/min.



Figura 6. Foto del 'loop' que se llenaba con la dispersión de NPs.

En la figura 7 se muestran las reacciones que tienen lugar adherir las NPs de magnetita al polímero de GMA según el protocolo 1.

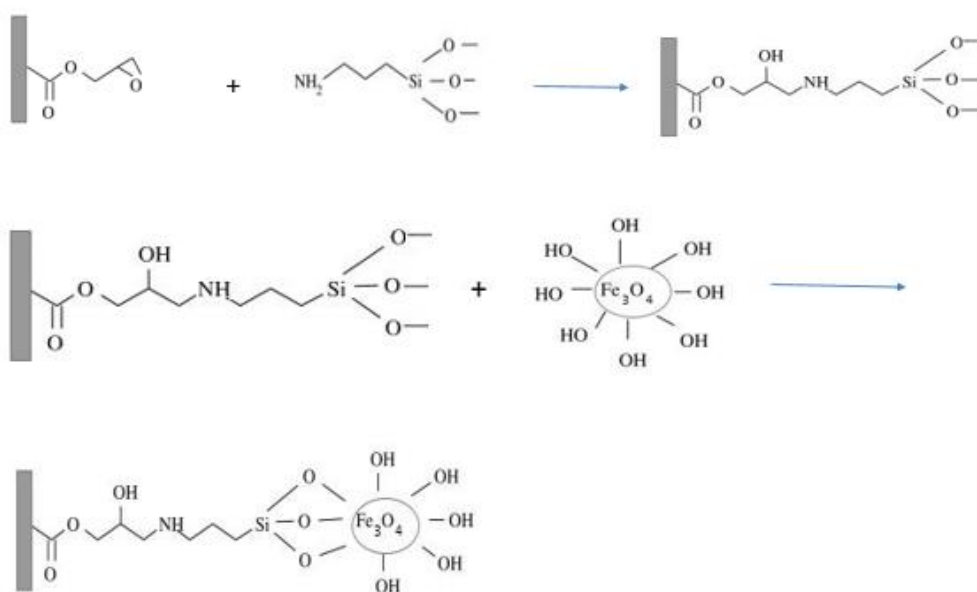


Figura 7. Reacción de unión de las NPs con polímero según el protocolo 1.

4.3.2. Adición de NPs mediante el protocolo 2 (columna R3)

La funcionalización con nanopartículas de magnetita de la columna R3 se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos:

1. Aminación de las nanopartículas de magnetita con APTMS.
Se pesaron 0.25 g de NPs y se mezclaron con 30mL de EtOH y 5mL de H₂O. La mezcla se puso en el ultrasonidos durante 20 min y, a continuación, se añadió a la dispersión 0.5mL de NH₃ 32% y 1mL de APTMS. La reacción se

mantuvo en agitación mecánica a temperatura ambiente durante 12h (figura 8). Las NPs aminadas se lavaron con agitación vortex durante 1 min. En primer lugar, con 3 fracciones de 10 mL de EtOH absoluto y, seguidamente, con 3 fracciones de 10 mL de una disolución de EtOH al 50%. Finalmente, se separan las NPs de la disolución con un imán de neodimio y se secan en el horno durante 4 horas a 50 °C. Al finalizar el secado, se almacenan las NPs aminadas el desecador.



Figura 8. Montaje para la reacción de aminación de las NPs de magnetita con APTMS

2. Reacción de las nanopartículas de magnetita aminadas con el polímero.

Se preparó una dispersión de NPs aminadas de 25 ppm en DMSO con la ayuda de ultrasonidos (20 minutos).

Se hizo pasar a través de la columna R3 la dispersión de las NPs aminadas impulsándola con la bomba del HPLC a 0.05 mL/min, usando el montaje que se muestra en la figura 6: procediendo como se ha descrito anteriormente. La fase móvil, DMSO 100%, arrastraba la disolución de NPs aminadas hasta la columna, que se mantuvo durante todo el proceso en el horno de columnas a 60°C. La adición de la disolución de NPs aminadas se prolongó durante 12 horas.

El proceso termina con el lavado de la columna con DMSO durante 30 minutos.

En la figura 9 se muestran las reacciones que tienen lugar adherir las NPs de magnetita al polímero de GMA según el protocolo 2.

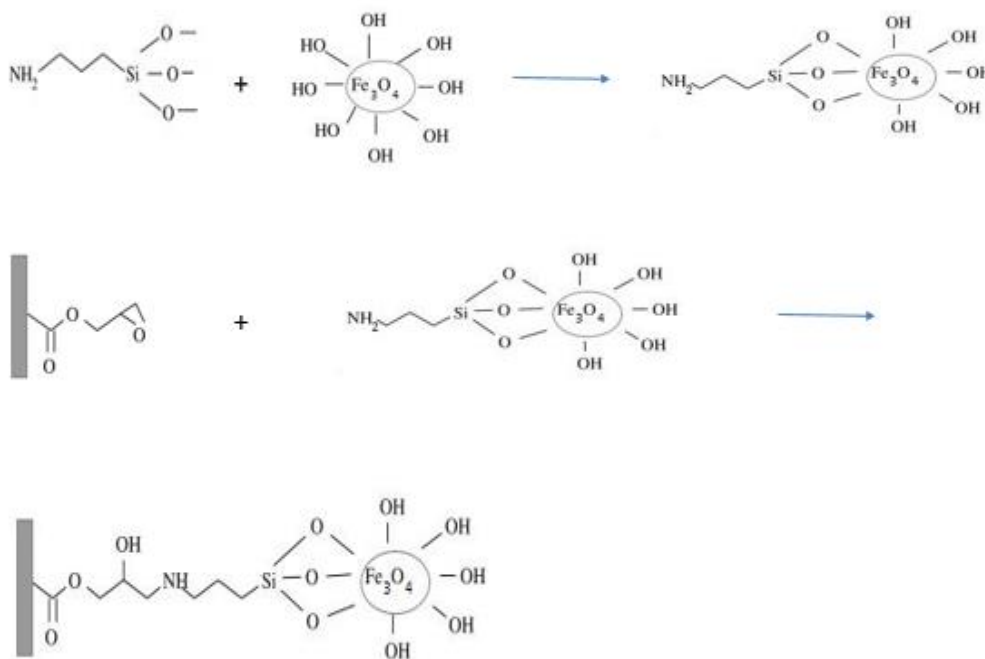


Figura 9: Reacción de adición de las NPs al polímero según el protocolo 2.

4.4 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FOSFOPEPTIDOS

Las sustancias seleccionadas para evaluar la capacidad de separación de las columnas desarrolladas, han sido tres fosfopéptidos (FPs). AMP, ADP y ATP, cuyas características se describen en la introducción. Se trata de moléculas con átomos de fósforo en su estructura, que se prevé que interaccionará con los átomos de hierro de la columna monolítica preparada. El hecho de que estos FPs se diferencien en el número de átomos de fósforo hace pensar que tendrán un comportamiento diferenciado.

Se prepararon disoluciones patrón de 2000 ppm de cada uno de los FPs en agua y, por dilución se preparan las disoluciones de mezcla de los 3 fosfopéptidos.

La separación óptima de los FPs se consiguió con la columna R3 (columna modificada con NPs de magnetita mediante el protocolo 2), utilizando el gradiente que muestra en la tabla 5. Se inyectó en el sistema cromatográfico 1 μ L de mezcla de ATP, ADP y AMP de 150 ppm cada uno, trabajando a un caudal de 0.5 mL/min.

Tabla 5. Gradiente óptimo para la separación de los FPs

Tiempo (min)	ACN (%)	Tampón fosfato 10 mM pH 6.5 (%)
0	100	0
2	100	0
7,5	60	40
11	60	40
12	100	0
16	100	0

En estas mismas condiciones, se inyectó la mezcla de los 3 fosfopéptidos con la columna de referencia, R4 (sin NPs ancladas).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIO DE LA DISTANCIA A LA LÁMPARA Y TIEMPO DE REACCIÓN

La modificación de la pared interna del soporte (tubo ETFE) se realizó con la BZF y EDMA con radiación ultravioleta (fotografting).

Se estudió la influencia de la distancia de la lámpara al tubo en el proceso de activación de la pared interna del soporte. Se probaron dos distancias a la lámpara: 5 y 15 cm, utilizando tiempos de radiación de 15 minutos para cada reactivo. Se observó un mayor ataque de la pared del teflón al utilizar la distancia más cercana, 5 cm, lo que se concluyó visualmente por el aspecto blanquecino del tubo tras la reacción.

Por otra parte, se ensayó la importancia del tiempo de radiación sobre la BZF y el EDMA. Se estudiaron tiempos entre 15 min y 1 hora. Los resultados mostraron que con 30 minutos es suficiente para que el tubo quede activado y el polímero se enlace correctamente. Con tiempos de reacción más cortos, el monolito se escapaba al lavar, por no estar bien anclado al soporte.

Por tanto, se concluye para definir el protocolo de preparación de las columnas que se usará una distancia de 5 cm a la lámpara y un tiempo de 30 minutos para reacción del BZF y del EDMA.

5.2 PORCENTAJE DE GMA EN LA MEZCLA DE POLIMERIZACIÓN

La unión del APTMS o la NP-aminada al polímero se realiza a través del grupo epóxido del GMA, por lo que se planteó estudiar el porcentaje de GMA en la mezcla de polimerización para conseguir que la cantidad de NPs unidas finalmente al monolito polimérico fuera la máxima posible. Se ensayaron porcentajes de GMA entre 30% y 80% y se obtuvieron los siguientes resultados:

- Porcentajes del 60% o superiores dieron presiones elevadas en el lavado del polímero y el polímero acabó saliéndose debido a la presión.
- Con 50% GMA, la presión tras el lavado de la columna fue de 10-12 bar, pero aumentó hasta 17-18 tras la etapa de adición del APTMS (Protocolo 1). Al empezar a añadir NPs de magnetita, la presión llegó a aumentar hasta 50-60 bar debido a la agregación de las NPs en la entrada de la columna y la columna se rompió.
- Finalmente, se seleccionó como óptimo un 40% de GMA en la mezcla de polimerización para evitar presiones elevadas. Se obtuvieron así columnas con presión inicial tras el lavado de 5-6 bar.

Por lo tanto, se prepararon cuatro columnas (R1, R2, R3 y R4) con un 40% de GMA para ensayar los diferentes protocolos de funcionalización del polímero con las nanopartículas de magnetita.

5.3 FUNCIONALIZACIÓN DEL POLÍMERO CON NPs DE MAGNETITA

Tal y como hemos comentado en el apartado 4.3 la adición de las NPs de hierro al polímero se puede realizar mediante dos protocolos: tratando la columna polimérica con APTMS y, posteriormente, añadiéndolas NPs (protocolo 1), o tratando primero las NPs con el APTMS y, posteriormente, añadiendo las NPs funcionalizadas al monolito polimérico (protocolo 2).

5.3.1 Resultados de la funcionalización del polímero con las NPs siguiendo el protocolo 1. Columna R1

En este caso se preparó la dispersión de NPs en EtOH 50% y citrato 1.5%. Al adicionar las NPs a la columna (R1) sucedió lo siguiente:

- La presión inicial para este experimento fue de 5 bar. Tras 6 horas de inyección de NPs no se observó coloración del polímero y, en todo momento, la disolución saliente de la columna presentaba el mismo tono que la disolución de entrada, por lo que se dedujo que las NPs no se estaban quedando retenidas en la columna, es decir, no había reacción entre las NPs y el polímero.
- Además, durante el proceso de adición se registró una subida de presión muy rápida hasta 11bar. En ese momento decidimos parar el experimento y ver si había algún problema con la columna. Al quitar el 'fitting' se observó que algunas NPs se estaban agregando en la entrada de la columna lo que provocaba un taponamiento de la entrada. La foto de la figura 10 muestra el aspecto de la columna al quitarle el fitting. Fue por tanto necesario controlar en todo momento la presión para poder detectar si se producían cambios significativos de presión que pudieran perjudicar a la columna, rompiéndola o provocando la separación del polímero de la pared del capilar.

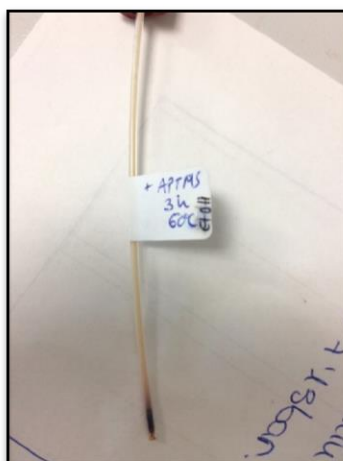


Figura 10. Foto de la columna R1 tras la adición de NPs con el protocolo 1

Con este estudio se concluyó que la dispersión de las NPs en una mezcla de EtOH y citrato no era adecuada para conseguir la funcionalización de la columna con NPs.

5.3.2 Resultados de la funcionalización del polímero con las NPs siguiendo el protocolo 1. Columna R2

En este caso se preparó la dispersión de NPs en dimetilsulfóxido. La dispersión de las NPs en DMSO aparentemente era mejor, ya que la disolución era más transparente, de forma que se pensó que quizás se evitaban los problemas de aglomeración de NPs en la entrada de la columna. Sin embargo, la columna R2 se comportó igual que la columna R1, y tras unas horas de adición de NPs, no se apreció ningún indicio de anclaje de las NPs en la columna, ocurriendo los mismos problemas de presión, por lo que se descartó su uso.

5.3.3 Resultados de la funcionalización del polímero con las NPs siguiendo el protocolo 2. Columna R3

Las NPs se aminoraron con APTMS y se adicionaron a la columna mediante el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se describen a continuación

Desde el comienzo de la adición de las NPs aminadas a la columna R3 se observó un cambio de color entre la disolución de entrada y la de salida de la columna: la disolución de entrada era amarilla, mientras que la disolución de salida había perdido su color y era prácticamente incolora (figura 11). Esto indicó que las NPs se estaban quedando adheridas al polímero en la columna.

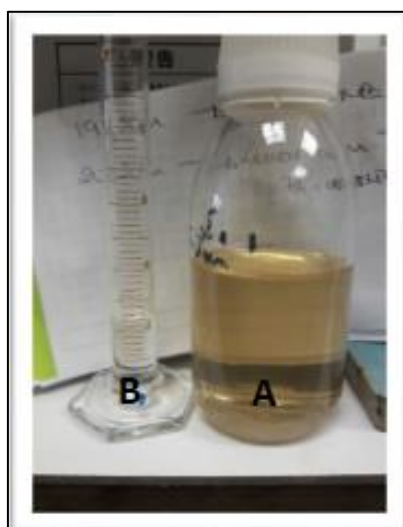


Figura 11. Color de las disoluciones de NPs de entrada (A) y salida (B) de la columna.

Tras 3 horas de inyecciones, el líquido de salida continuó siendo completamente incoloro y la presión se mantuvo constante en 5 bar. Se observó que la columna que se iba tiñendo de color marrón; en ese momento, un tercio de la columna está de color marrón, tal y como se muestra en la figura 12. Esto indicaba que las NPs se están adheriendo al polímero.



Figura 12. Columna R3 tras 3 horas de tratamiento

Tras 7 horas de tratamiento, entorno al 60% de la columna había reaccionado con las NPs (Figura 13) . Las NPs reaccionaban progresivamente con la columna.



Figura 13. Columna R3 tras 7 horas de tratamiento

Tras 12 horas de reacción, la disolución de salida empieza a verse coloreada (imagen 14, izquierda), lo que nos indicó que la columna estaba saturada de NPs y, por tanto, no hacía falta alargar del proceso de adición de NPs. En ese momento, toda la columna había reaccionado con las NPs (imagen 14, derecha). La presión al final del proceso fue de 7 bar.

Con los resultados obtenidos con ambos protocolos, en los que sólo se observa una clara adherencia de las NPs sobre el polímero con la columna 3 (Protocolo 2 de adición de NPs), se decidió evaluar las posibilidades de separación de compuestos fosforados en HPLC utilizando la columna sintetizada.



Figura 14. Izquierda: color de la disolución NPs a la entrada y a la salida de la columna. Derecha: columna R3 con las NPs unidas al polímero (12 horas de tratamiento).

5.4 SEPARACIÓN DE FPs

Una vez diseñada la columna monolítica funcionalizada con nanopartículas de magnetita, y dada la posible interacción entre el hierro y los compuestos fosforados, se seleccionaron los fosfatos de adenosina (FPs) como analitos de prueba para evaluar la capacidad de separación de la columna.

La dificultad reside en dar con el gradiente adecuado que sea capaz de separar cromatográficamente estos compuestos, variando los flujos de las fases móviles, la intensidad el flujo y controlando la presión que se ejerce en cada momento sobre la columna ya que un aumento elevado del flujo podría provocar un aumento de la presión que sufre la columna pudiendo provocar roturas del polímero, del anclaje del polímero sobre la pared del ETFE dejando inservible la columna.

5.4.1 Estudio de la elección del pH de la fase móvil

Para estudiar la capacidad de separación de los FPs con la Columna R3, se probaron en isocrático diferentes fases móviles, ACN:Agua, ACN:Tampón fosfato pH 6.5 10 mM, ACN:Tampón acético/acetato 8 mM pH 5.0, ACN:Tampón Fosfato 10 mM pH 8.0, variando el porcentaje de acetonitrilo del 100% al 0%.

Como ejemplo, se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar 1 μ L de blanco (agua) y una disolución de 100 ppm de AMP en el sistema cromatográfico, con una fase móvil isocrática con un 90% de acetonitrilo y un 10% de tampón: tampón fosfato 10 mM pH 8 (figura 15), tampón fosfato 10 mM pH 6.5 (figura 16), y tampón acetato 8 mM pH 5 (figura 17).

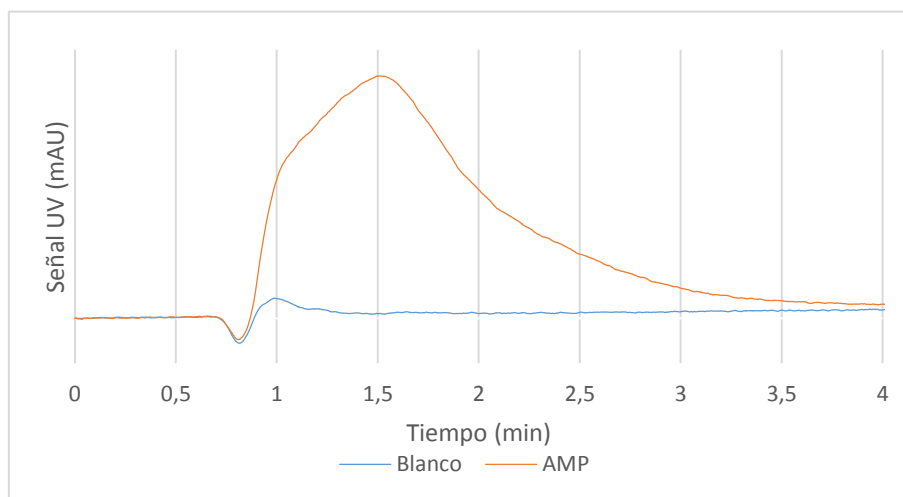


Figura 15. Cromatograma del AMP 100 ppm y blanco con una fase móvil 90%ACN:10% Tampón fosfato 10 mM de pH 8.

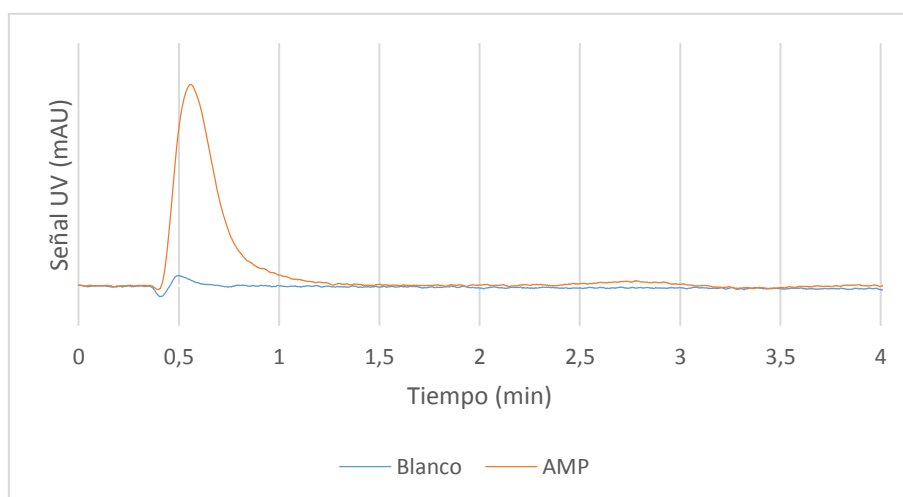


Figura 16. Cromatograma del AMP 100 ppm y de un blanco con una fase móvil 90%ACN:10% Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5.

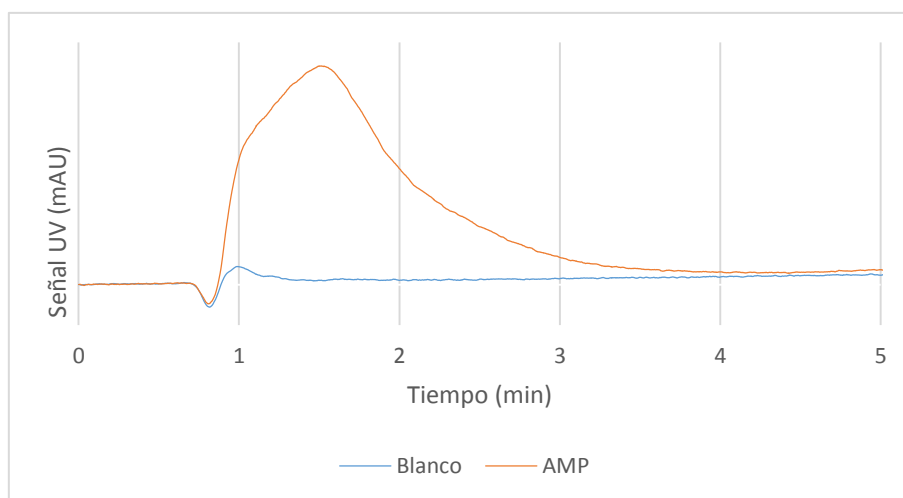


Figura 17. Cromatograma del AMP y de un blanco con una fase móvil 90%ACN:10% Tampón de pH 5.0.

Tal y como vemos en los cromatogramas anteriores, la eficacia del pico del AMP es mayor con la fase móvil de pH 6.5. Por lo tanto, se seleccionó este pH como el óptimo.

5.4.2 Estudio de la composición de la fase móvil ACN:tampón fosfato 10 mM de pH 6.5

Una vez concretado el pH de la fase acusa que se debía utilizar, se pasó a evaluar el comportamiento los FPs a diferentes concentraciones de ACN. Para ello, se inyectaron en modo isocrático los tres FPs, variando el porcentaje de ACN entre el 0% y el 100%.

Con porcentajes de acetonitrilo inferiores al 70%, los 3 fosfopéptidos salían en la cabeza del cromatograma, al mismo tiempo de retención. A partir del 70%, ADP y ATP empezaban a retrasarse, apareciendo picos muy anchos y desdoblados.

Como ejemplo, se muestran los cromatogramas para fases móviles isocráticas con porcentajes de ACN en la fase móvil de 70% (figura 18), 75% (figura 19), 85% (figura 20) y 90% (figura 21), obtenidos al inyectar 1 μ l de blanco (agua) y patrones de AMP, ADP y ATP en el sistema cromatográfico.

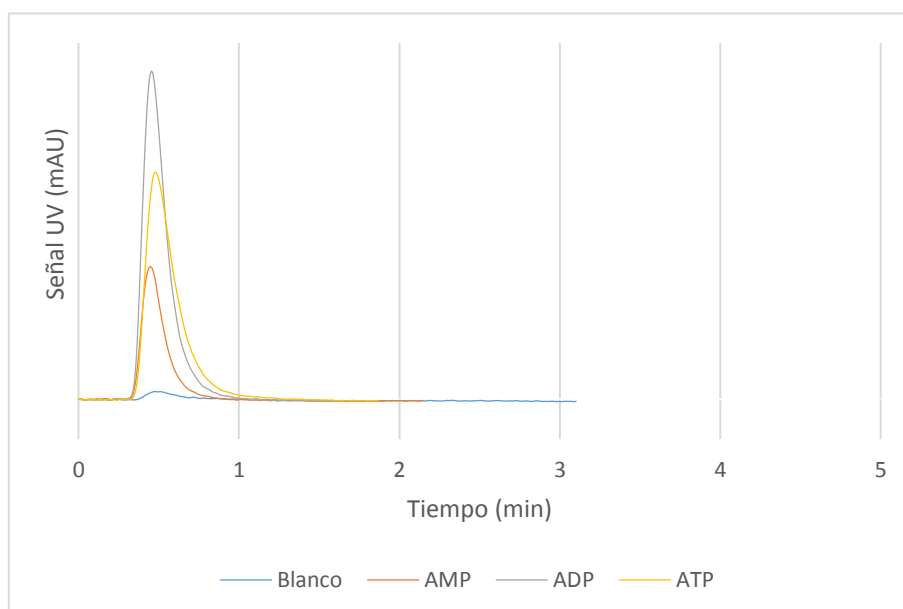


Figura 18. Cromatograma del AMP, ADP y ATP y un blanco con una fase móvil isocrático con un 70% ACN y un 30 % Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5

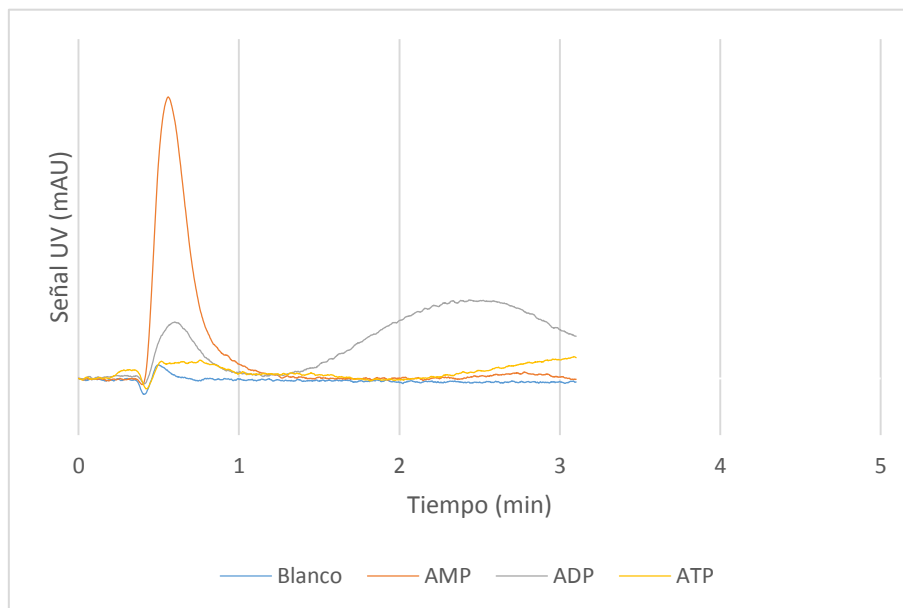


Figura 19. Cromatograma del AMP, ADP y ATP y un blanco con una fase móvil isocrático con un 75% ACN y un 25 % Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5.

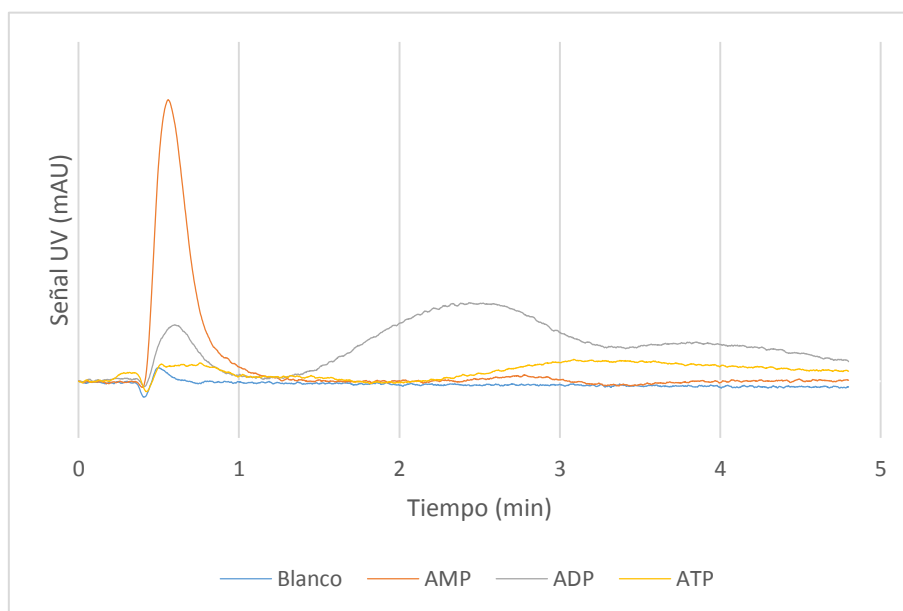


Figura 20. Cromatograma del AMP, ADP y ATP y un blanco con una fase móvil isocrático con un 85% ACN y un 15 % Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5.

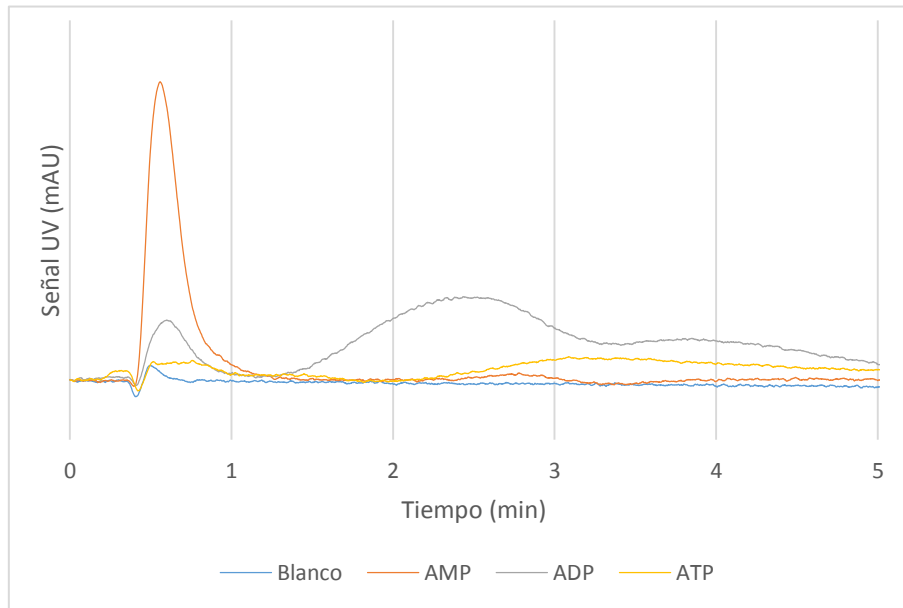


Figura 21. Cromatograma del AMP, ADP y ATP y un blanco con una fase móvil isocrática con un 90% ACN y un 10 % Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5.

Se concluye que el AMP es el FP menos retenido, ya que incluso con 90% de ACN, sale en cabeza. Por ello, se hace necesario aumentar todavía más el %ACN para poder observar su retención.

Por otra parte, con ADP y ATP se observa que la retención aumenta al aumentar el %ACN en la fase móvil, desdoblándose y achatándose los picos.

Respecto del orden de elución de los 3 FPs, se observa con altos %ACN que la retención de ATP es mayor que la de ADP, y esta mayor que la de AMP, lo cual resulta lógico pensando que los FPs interactúan con la columna gracias a la presencia de los grupos fosfatos con las NPs.

5.4.3 Estudio de gradiente óptimo de la fase móvil ACN:tampón fosfato 10 mM pH 6.5

Puesto que hemos demostrado que no se pueden separar con eficacia los FPs ADP y ATP trabajando en modo isocrático, se decidió estudiar gradientes para conseguir la correcta separación de los tres FPs.

Se estudiaron diferentes gradientes partiendo de un 100%ACN. Con esta fase móvil los 3 FPs se retienen en la columna y no salen hasta que se inicia el gradiente y empieza a haber fase tampón.

Se estudiaron diferentes efectos en la separación de los FPs:

- el porcentaje de fase tampón al que se llega con el gradiente
- la velocidad de flujo
- la pendiente del gradiente (rampa)
- el tiempo al que se inicia el gradiente

Se observó que:

- Era necesario llegar a un 60% de fase tampón para que los 3 FPs saliesen de la columna con eficacia de separación.
- La velocidad de flujo se varió entre 0.3-0.7 mL/min y no se observaron cambios significativos en la separación, pero la presión aumentaba ligeramente al aumentar el flujo. Por ello, se consideró que un flujo de 0.5 mL/min era adecuado
- Respecto de la pendiente de gradiente, se llegó a la conclusión de que con 3.5 min de rampa la eficacia de separación de los FPs era buena
- El tiempo de inicio de la rampa se varió entre 0 y 5 minutos. En la Figura 22, se muestran 3 de los gradientes empleados en este estudio, con 1, 2 y 3 minutos de tiempo antes del inicio de la rampa. Los cromatogramas con estos 3 gradientes (figuras 23, 24, 25) muestran cómo los tiempos de retención de los FPs aumentan al aumentar el tiempo de inicio, aunque la eficacia de separación es adecuada en todos los casos.

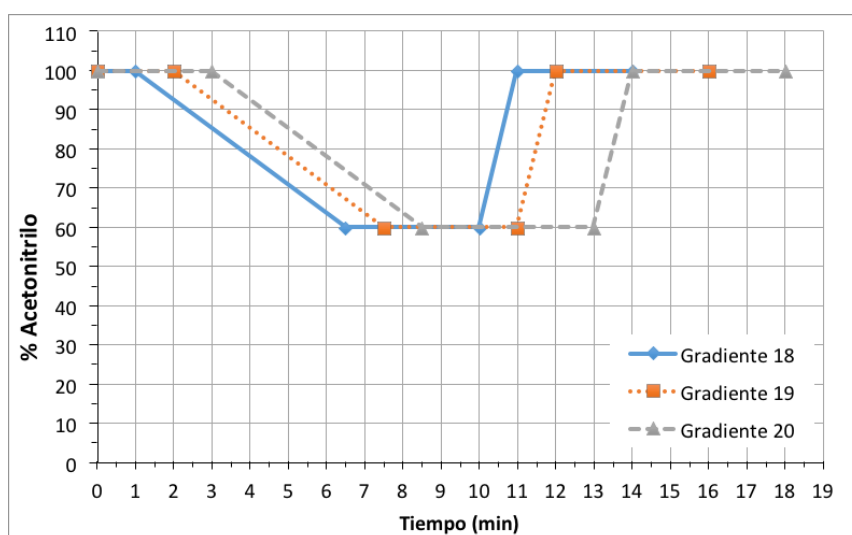


Figura 22. Representación de 3 de los gradientes estudiados con diferentes tiempos de inicio para la separación de los FPs.

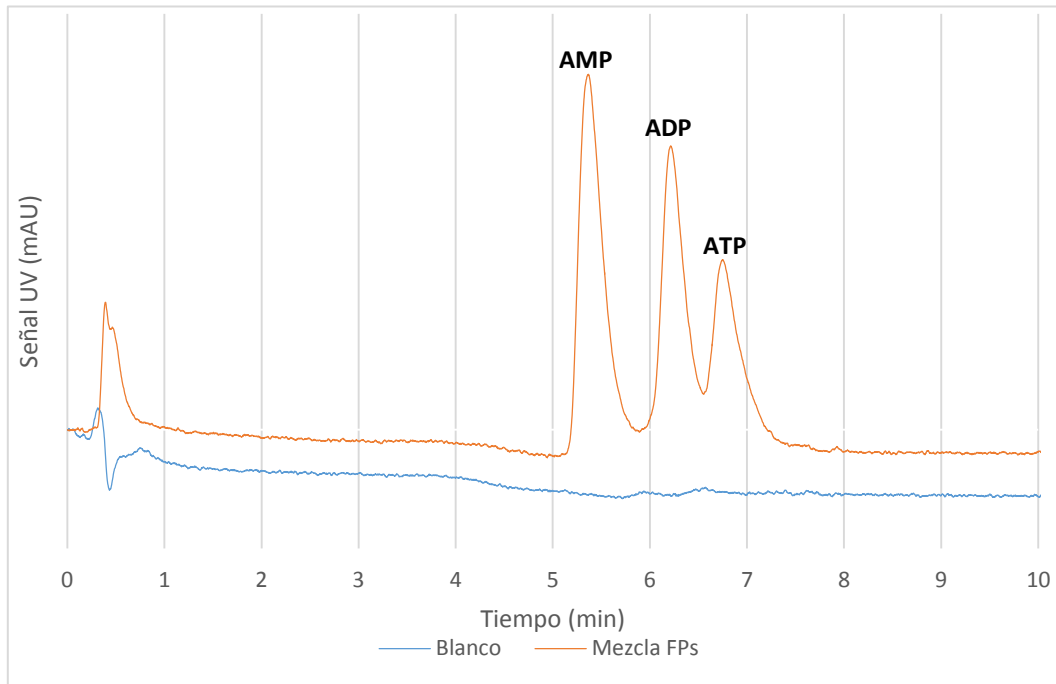


Figura 23. Cromatograma de blanco y mezcla del AMP, ADP y ATP (150 ppm cada uno) obtenido con una fase móvil ACN:Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5 con el gradiente 18.

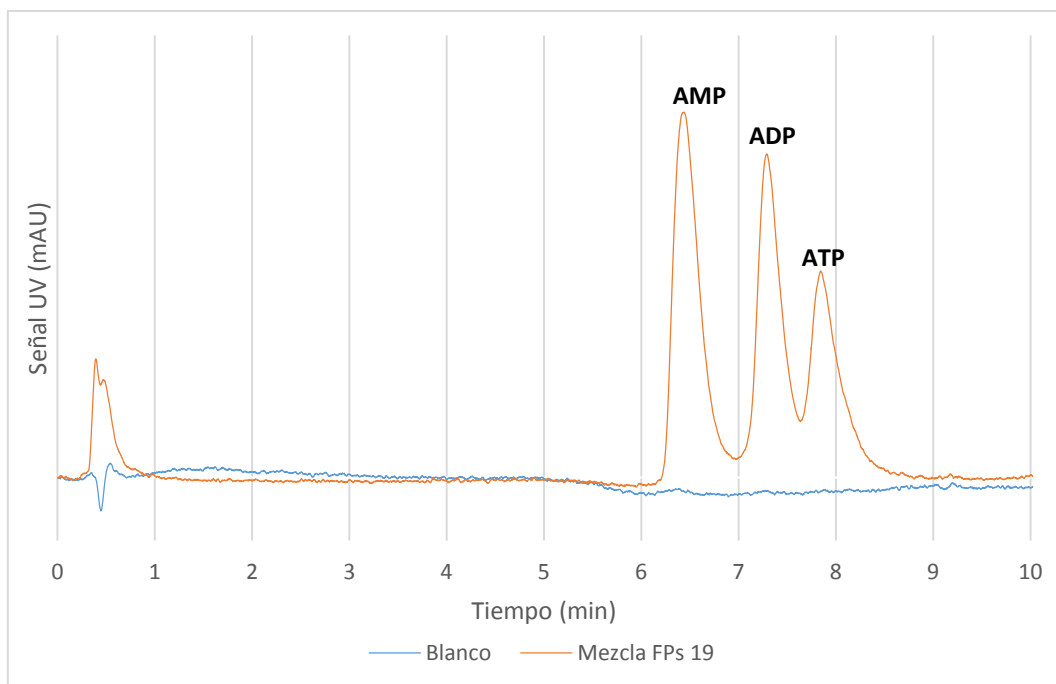


Figura 24. Cromatograma de blanco y una mezcla del AMP, ADP y ATP (150 ppm cada uno) obtenido con una fase móvil ACN:Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5 con el gradiente 19.

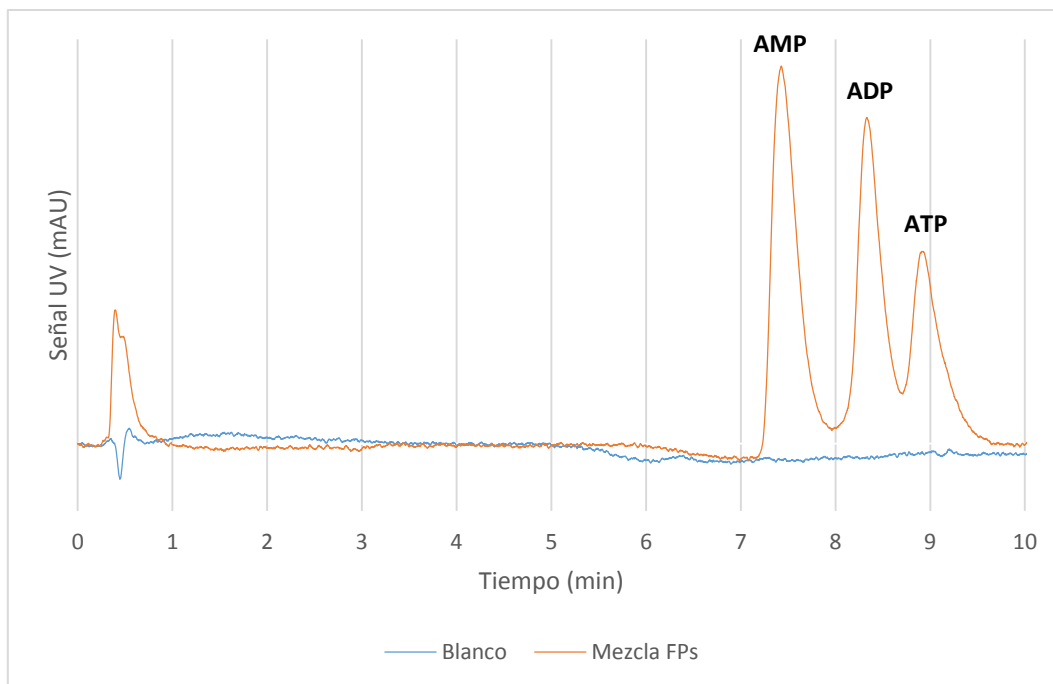


Figura 25. Cromatograma de blanco y una mezcla del AMP, ADP y ATP (150 ppm cada uno) obtenido con una fase móvil ACN:Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5 con el gradiente 19.

5.4.4 Estudio del comportamiento cromatográfico de la columna de referencia (R4)

Se estudió el comportamiento cromatográfico de la columna de referencia (R4), una columna con el mismo monolito polimérico que el resto de columnas, pero a la que no se le han añadido NPs de magnetita.

Se inyectaron los tres FPs con la fase móvil óptima y se observó que, aunque los compuestos se retuvieron en la columna, es decir, que existe interacción, no se obtuvo una adecuada separación entre AMP, ADP y ATP, como se observa en la figura 26, en la que se representa los cromatogramas obtenidos al inyectar 1 μ L de una disolución mezcla de los tres FPs y de un blanco. Por otra parte, en el blanco se observan perturbaciones en la línea base en la zona de los picos de los analitos.

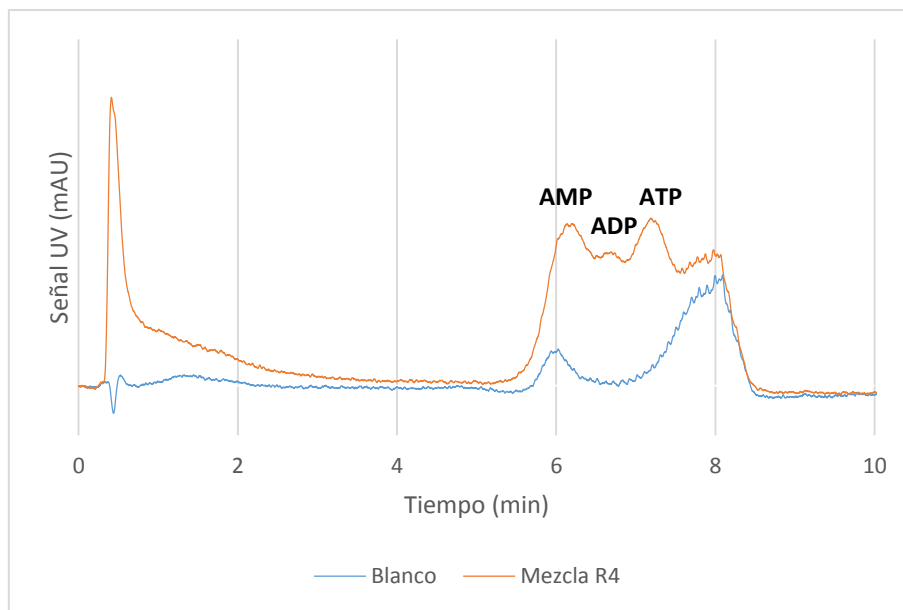


Figura 26. Cromatograma de blanco y una mezcla de AMP, ADP y ATP (150 ppm cada uno) obtenido con la columna de referencia, R4, con una fase móvil ACN:Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5 con el gradiente 19.

En la figura 27 se puede comparar las diferencias en el comportamiento de retención de los FPs en la columna monolítica modificada con NPs frente a la que no ha sido modificada. Los FPs salen un poco antes con la columna de referencia, lo cual indica una mayor afinidad de los compuestos por la fase estacionaria modificada con NPs.

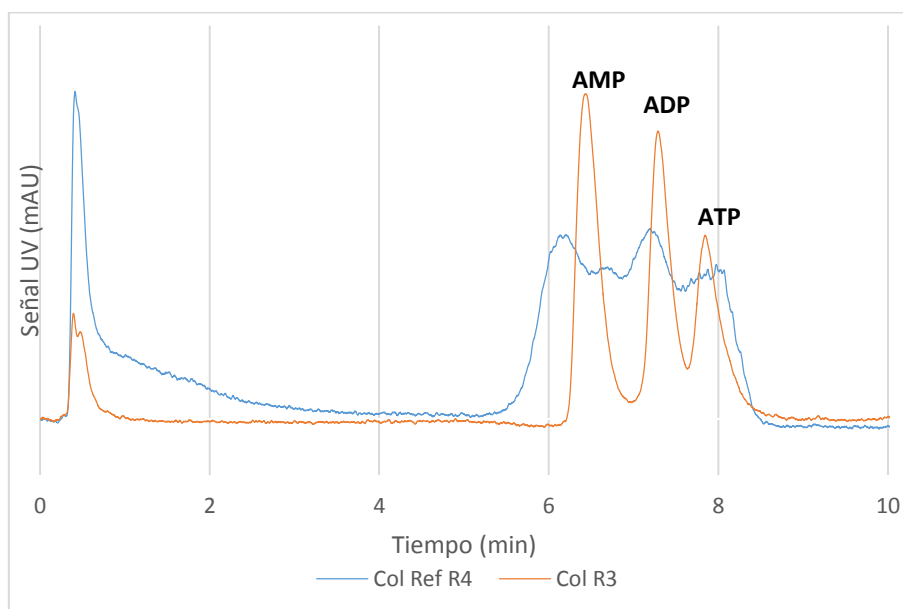


Figura 27. Cromatogramas de la mezcla de AMP, ADP y ATP obtenidos con la columna de referencia (R4, línea azul) y con la columna modificada con NPs (R3, línea naranja). Fase móvil ACN:Tampón fosfato 10 mM de pH 6.5 con el gradiente 19.

6. CONCLUSIONES

El soporte elegido para la obtención de una nueva columna monolítica polimérica ha sido el ETFE, cuya pared interna ha sido adecuadamente activada los reactivos EDMA y BZF en presencia de radiación ultravioleta (fotografting), para asegurar el posterior anclaje del polímero. Se ha comprobado que situando la columna a una distancia de 5 cm de los tubos UV y con un tiempo de irradiación de 30 min el ataque es adecuado.

Se prepararon 4 réplicas de la columna monolítica polimérica a partir de una mezcla de polimerización con 40% de GMA, que dieron en el sistema HPLC una presión adecuada para las condiciones de trabajo.

Posteriormente, se realizó la funcionalización del monolito con NPs de magnetita (Fe_3O_4) para obtener una fase estacionaria que interaccionara de forma específica con moléculas que tuviesen átomos de fósforo en su estructura. Tres de las columnas sintetizadas se utilizaron para estudiar el método más adecuado de adición de las NPs de Fe mediante el reactivo de silanización APTMS ((3-aminopropil)-trimetoxisilano); la cuarta columna se dejó sin tratar, siendo la columna de referencia.

Se usaron dos estrategias diferentes para conseguir el anclaje de NPs al polímero:

- El primer protocolo probado consistía en una primera etapa en la que reaccionaba el APTMS con el monolito polimérico, para su silanización. Posteriormente, se hizo pasar una dispersión de NPs, en EtOH (columna R1) o en DMSO (columna R2), a través de la columna. Este protocolo no resultó adecuado ya que, por una parte, las NPs que pasaban a través de la columna no reaccionaban con el polímero funcionalizado y, por otra parte, algunas NPs se quedaban amontonadas en la entrada de la columna.
- El segundo protocolo consistió en hacer reaccionar, en primer lugar, las NPs con el APTMS, para obtener NPs-aminadas y, posteriormente, hacer pasar una dispersión de las NPs-aminadas en DMSO a través de la columna. Este proceso resultó adecuado para el anclaje de la NPs sobre el monolito polimérico (columna R3).

Finalmente, se probó el comportamiento de la columna monolítica modificada con NPs (R3) con un grupo de compuestos de prueba (fosfopéptidos) que se diferencian en el número de átomos de fósforo: adenosin monofosfato (AMP), adenosin difosfato (ADP) y adenosin trifosfato (ATP). En este estudio se concluyó que se obtiene la mejor separación realizando un gradiente de las fases móviles acetonitrilo y tampón fosfato 10 mM de pH 6.5. En estas condiciones fue posible separar los tres compuestos ensayados en 10 min con una buena eficacia en la separación. La misma operación realizada con la columna de referencia (R4), aunque retenía los tres compuestos, no permitió su diferenciación.

Se puede concluir que se han cubierto los objetivos del proyecto al preparar la columna híbrida monolito-NPs y comprobar su capacidad para interaccionar selectivamente con compuesto con diferente número de átomos de fósforo.

7. BILIOGRAFIA

- Blog Enrique Castaños, fecha de consulta julio 2017. <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/cromatografia/>.
- Cantó Mirapeix, M. D. "Preparación y caracterización de nuevas columnas monolíticas de acrilato y metacrilato para electro cromatografía capilar". (2009).
- Catalogo Agilent®, Guía para selección de columnas para HPLC, www.agilent.com. Fecha de consulta agosto 2017.
- Catalogo Teknokroma®. Fecha de consulta agosto, 2017. <http://www.teknokroma.es/es/Productos/cromatografia-de-hplc/5/Default.aspx>
- Chemical book, "3-Aminopropyltriethoxysilane | 919-30-2". *Chemicalbook.com*. Retrieved 2012-08-01. Fecha de consulta julio 2017. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8686147.htm
- De Marina Bayo, A. G., & Marco, D. J. Y. *HPLC instrumental*. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia (2016).
- Eduardo Gherhman. Fecha de consulta junio 2017. <http://www.galileog.com/ciencia/biologia/cinesina/cinesina.htm> (2015)
- Gomis Yagües, V. Tema 3. Cromatografía de gases. *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial*. (2008)
- Krenkova, J., & Foret, F. Iron oxide nanoparticle coating of organic polymer-based monolithic columns for phosphopeptide enrichment. *Journal of separation science*, 34(16-17), 2106-2112. (2011).
- Lu, A. H., Salabas, E. E., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244.
- Mahouche-Chergui, S., Guerrouache, M., Carbonnier, B., & Chehimi, M. M. Polymer-immobilized nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 439, 43-68. (2013).
- Mikko Helenius, Sirpa Jalkanen, Gennady G. Yegutkin, "Enzyme-coupled assays for simultaneous detection of nanomolar ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine and pyrophosphate concentrations in extracellular fluids." (2012)
- Nordborg, A., & Hilder, E. F. Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394(1), 71-84. (2009).
- Oscar Núñez, "Columnas monolíticas de base sílice: propiedades, preparación, modificaciones químicas y aplicaciones en cromatografía de líquidos" (2008).
- Pei Jin Xie, Ming Li Ye, Zhong Yang Hu, Guang Wen Pan, Yan Zhu, Jia Jie Zhang. "Determination of levels of adenosine phosphates in blood by ion chromatography" (2011).
- Ríos, A., Zougagh, M., & Bouri, M. Magnetic (nano) materials as a useful tool for sample preparation in analytical methods. A review. *Analytical Methods*, 5(18), 4558-4573 (2013).
- Silva, R. G. D. C., Collins, C. H., & Bottoli, C. B. G. Cromatografía líquida capilar: estado da arte e aplicações. *Química Nova* (2011).
- Wing, C. E. G. Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial. *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*, 24-29 (2006).