

**RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS PARA ELECTROFORESIS CAPILAR
SINTETIZADOS VÍA POLIMERIZACIÓN RADICALARIA
DE TRANSFERENCIA ATÓMICA**

FABIAN HERLEY NAVARRO PEÑA



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI**

2014

**RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS PARA ELECTROFORESIS CAPILAR
SINTETIZADOS VÍA POLIMERIZACIÓN RADICALARIA
DE TRANSFERENCIA ATÓMICA**

FABIAN HERLEY NAVARRO PEÑA

Director: Junior E. Sandoval, Ph.D.

**Trabajo de tesis entregado como requisito parcial para optar por el título de
Magister en Ciencias – Química**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI**

2014



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ACTA DE SUSTENTACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS-QUÍMICA

Jurado confirmado por los Doctores:

FERNANDO LUNA VERA, Grupo de Investigación en Desarrollo de Materiales y Productos, ASTIN, Sena, Cali.
WALTER TORRES HERNÁNDEZ, Universidad del Valle.

El día 15 de octubre de 2014 a las 3:00 p.m. se llevó a cabo la sustentación del Trabajo de Investigación titulado: **“RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS PARA ELECTROFORESIS CAPILAR SINTETIZADOS VÍA POLIMERIZACIÓN RADICALARIA DE TRANSFERENCIA ATÓMICA”**, presentado por el estudiante de Maestría, **Fabián Herley Navarro Peña**, código 1100208, Plan 7173, candidato a grado para la próxima ceremonia.

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN:

APROBADA () MERITORIA () LAUREADA

Regístrese esta calificación.

- () REPROBADA: El estudiante debe matricularse en esta actividad.
() PENDIENTE: El estudiante debe acoger las recomendaciones del jurado y presentar nuevamente el documento ante el Director de Tesis.
() Requiere () No requiere nueva sustentación.
El plazo para nueva sustentación y/o presentación del documento es de: _____

OBSERVACIONES

- Revisar pKa de cafeína y piridina y la discusión derivada de allí.
- Mostrar los cambios en las separaciones en función de las etapas de tratamiento de los capilares.

Santiago de Cali, 15 de octubre de 2014.

Dr. Fernando Luna Vera
Jurado

Dr. Walter Torres Hernández
Jurado

Dr. Junior E. Sandoval
Director del Trabajo de Investigación

Dr. Julián Diez Urresta A.
Director Programa Académico
Coordinador de la sustentación

A mi familia. Mis padres, Tirso Navarro y Marleny Peña, mis hermanas, Yuliana Navarro Peña, Marla Navarro Peña, por su apoyo moral y espiritual durante mi formación como persona y como magister en química.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	0
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
3. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	3
3.1. HPCE COMO HERRAMIENTA ANALÍTICA	3
3.2. FASES ENLAZADAS PARA HPLC Y HPCE	6
3.3. ESQUEMA SINTÉTICO DEL PRESENTE TRABAJO	13
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	15
4.1. EQUIPOS.....	15
4.2. MATERIALES	16
4.3. REACTIVOS	17
4.4. PROCEDIMIENTOS PARA MODIFICACIÓN DE SUPERFICIES.....	18
4.4.1. Secado de solventes.....	18
4.4.2. Pretratamiento de placas y columnas capilares.....	18
4.4.3. Formación de hidruro sobre sílica.....	19
4.4.4. Hidrosililación.....	20
4.4.5. Esterificación de la sílica modificada con propanol.....	21
4.4.6. Polimerización	21
4.5. PROCEDIMIENTOS PARA EVALUACION DE CAPILARES Y PLACAS	23
4.5.1. Ángulos de contacto	23
4.5.2. Medición de movilidad electroosmótica	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1. SÍLICA MODIFICADA CON GRUPOS PROPANOL.....	25
5.2.1. Caracterización espectroscópica	25
5.2.2. Hidrofilicidad	30
5.2.3. Caracterización CE	31
5.2. ESTERIFICACIÓN – INMOVILIZACION DEL INICIADOR BMP.....	37

5.3. EVALUACIÓN ESPECTROSCÓPICA Y MICROGRÁFICA DE RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS.....	40
5.4. CAPILARES MODIFICADOS CON POLÍMERO	45
5.4.1. Concentración de monómeros y entrecruzantes	48
5.4.2. Separación CE de proteínas y péptidos.....	57
6. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	75
APÉNDICE A. Efecto de la concentración de Ru(bpy) ₃ ²⁺ y lisozima sobre su perfil CE.....	80
APÉNDICE B. NMR ¹³ C CP-MAS de sílica particulada recubierta con poliAAE y poliHEMA.....	81
APÉNDICE C. SEPARACIONES CE DE PROTEÍNAS	82

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de un sistema simple para electroforesis capilar.	4
Figura 2. Esquema general para ATRP.	11
Figura 3. Esquema de modificación de sustrato de sílica para obtener recubrimientos hidrofílicos covalentemente anclados.	14
Figura 4. Esquema de polimerización vía ATRP sin y con entrecruzamiento.	14
Figura 5. Sistema de modificación química de las columnas capilares.	19
Figura 6. Goniómetro construido en el laboratorio de Separaciones Analíticas de la Universidad del Valle.	23
Figura 7. Esquema que ilustra el protocolo utilizado para medir la electroósmosis por el método acelerado.	24
Figura 8. DRIFT de sílica (Nucleosil™) hidrurada y modificada con propanol.	26
Figura 9. NMR ¹³ C CP-MAS de sílica (Nucleosil™) modificada con propanol.	27
Figura 10. Representación esquemática de lisozima, de acuerdo con la referencia 62.	30
Figura 11. Electroferogramas típicos de piridina y cafeína (último pico) sobre capilar (A) no modificado, (B) hidrurado e hidrolizado, y (C) propanolado.	33
Figura 12. Efecto de la concentración de solutos sobre la migración y forma del pico del complejo Ru(bpy) ₃ ²⁺ (lado izquierdo) y lisozima (lado derecho) en capilar (A) no modificado, (B) hidrurado e hidrolizado y (C) propanolado.	36
Figura 13. DRIFT de sílica (Nucleosil™) modificada con propanol y luego esterificada (modificada con grupos BMP).	38

Figura 14. NMR ^{13}C CP-MAS de sílica (Vydac TM) modificada con propanol y luego esterificada (modificada con grupos BMP).	39
Figura 15. Espectro típico DRIFT de sílica (Nucleosil TM) modificada con iniciador BMP y luego con poliAAE, poliHEA y poliHEMA.....	40
Figura 16. Cobertura (Γ) sílica (Nucleosil TM) hidrurada, propanolada, iniciador BMP y polímeros de AAE, HEA y HEMA. n representa un estimado del grado de polimerización.....	42
Figura 17. Imágenes SEM de capilar modificado con poliAAE. A) Corte transversal del capilar de 50 μm , B) y C) acercamiento al borde del capilar.	43
Figura 18. Imágenes AFM de placas de sílica modificada con poliAAE (arriba) y no modificada (abajo). Áreas de muestreo de 2 μm ×2 μm	44
Figura 19. Perfil obtenido en 3D (izquierda) del perfil hecho por la punta de diamante sobre la placa modificada con poliAAE (derecha).	45
Figura 20. Esquema de condiciones experimentales ATRP.	47
Figura 21. Efecto de la concentración del monómero sobre la movilidad electroosmótica. Condiciones: capilares de 35.0 cm (longitud efectiva, 26.5 cm) y 50 μm id.	48
Figura 22. Efecto de la concentración del monómero AAE sobre el perfil electroforético del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (izquierda) y lisozima (derecha).	49
Figura 23. Efecto de la concentración del monómero HEA sobre el perfil electroforético del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (izquierda) y lisozima (derecha).	51
Figura 24. Efecto de la concentración del monómero HEMA sobre el perfil electroforético del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (izquierda) y lisozima (derecha).	52
Figura 25. Estructura de monómeros y correspondientes entrecruzantes empleados en este trabajo.	53
Figura 26. Efecto de la concentración del entrecruzante sobre la movilidad electroosmótica.	54

- Figura 27.** Efecto de la concentración del entrecruzante Bis sobre el perfil electroforético del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (izquierda) y lisozima (derecha).55
- Figura 28.** Efecto de la concentración del entrecruzante EGDA sobre el perfil electroforético del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (izquierda) y lisozima (derecha).56
- Figura 29.** Efecto de la concentración del entrecruzante EGDM sobre el perfil electroforético del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (izquierda) y lisozima (derecha).58
- Figura 30.** Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos entrecruzados. Solutos: (a) lisozima, (b) ribonucleasa A y (c) α -quimotripsinógeno.62
- Figura 31.** Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos entrecruzados. Solutos: (a) citocromo C, bovino, (b) tripsinógeno y (c) α -quimotripsinógeno.63
- Figura 32.** Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos entrecruzados. Solutos: (a) lisozima, (b) tripsina y (c) α -quimotripsinógeno.64
- Figura 33.** Separación de mezclas de péptidos en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos entrecruzados. Solutos: (a) angiotensina- H_1 , (b) angiotensina- H_2 , (c) bradiquinina y (d) oxitocina.65
- Figura 34.** Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos no entrecruzados. Solutos: (a) lisozima, (b) ribonucleasa A y (c) α quimotripsinogeno.67
- Figura 35.** Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos no entrecruzados. Solutos: (a) citocromo C, bovino, (b) tripsinógeno y (c) α -quimotripsinógeno.68
- Figura 36.** Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos no entrecruzados. Solutos: (a) lisozima, (b) tripsina y (c) α -quimotripsinogeno.....69
- Figura 37.** Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos no entrecruzados. Solutos: (a) angiotensina- H_1 , (b) angiotensina- H_2 , (c) bradiquinina y (d) oxitocina.70

Figura A 1. Efecto de la concentración de solutos sobre la asimetría y área corregida del pico del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (lado izquierdo) y lisozima (lado derecho) en capilar (A) sin modificar, (B) hidrurado (C) propanolado.	80
Figura B 1. Espectro poliAAE anclado sobre sílica (Nucleosil™).	81
Figura B 2. Espectro de poliHEMA anclado sobre sílica (Nucleosil™).	81
Figura C 1. Electroferogramas para la separación de mezclas de proteínas básicas, en capilar polimerizado con AAP-Bis.	82
Figura C 2. Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos de AAE entrecruzados y no entrecruzados.	83
Figura C 3. Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos de AAP entrecruzados y no entrecruzados.	84
Figura C 4. Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos de HEA entrecruzados y no entrecruzados.	85
Figura C 5. Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos de HEMA entrecruzados y no entrecruzados.	86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cobertura (Γ_{PrOH}) sobre sílica Nucleosil TM y YMC TM	29
Tabla 2. Datos de ángulos de contacto y EOM en placas y capilares respectivamente.....	31
Tabla 3. Cobertura (Γ) de sílica (Nucleosil TM) modificada con propanol y esterificada (modificada con grupos BMP)	39
Tabla 4. Resumen del efecto de entrecruzantes sobre el perfil electroforético del complejo Ru(bpy) ₃ ²⁺	59
Tabla 5. Resumen del efecto de entrecruzantes sobre el perfil electroforético de lisozima.....	59
Tabla 6. Biomoléculas empleadas para la evaluación CE de capilares recubiertos con películas poliméricas hidrofílicas. ¹	60
Tabla 7. Eficiencias de proteínas y péptidos separados a pH 3.7 en capilares con recubrimientos hidrofílicos entrecruzados (n = 3).	61
Tabla 8. Eficiencias de proteínas y péptidos separados a pH 3.7 en capilares con recubrimientos hidrofílicos no entrecruzados (n = 3).	71
Tabla 9. Precisión en tiempos de migración de proteínas y péptidos separados a pH 3.7 en capilares con recubrimientos hidrofílicos entrecruzados (n = 3).....	72
Tabla 10. Precisión en tiempos de migración de proteínas y péptidos separados a pH 3.7 en capilares con recubrimientos hidrofílicos no entrecruzados (n = 3).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abrev.	Abreviatura
AA	<i>Acrylamide</i>
AAE	<i>N-Acryloylaminoethanol</i>
AAP	<i>N-Acryloylaminopropanol</i>
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
ATRP	<i>Atom transfer radical polymerization</i>
Bis	<i>N,N'-Methylenebisacrylamide</i>
BMP	<i>2-Bromo-2-methylpropionate</i>
CE	<i>Capillary electrophoresis</i>
DRIFT	<i>Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy</i>
EGDM	<i>Ethylene glycol dimethacrylate</i>
EGDA	<i>Ethylene glycol diacrylate</i>
EOM	<i>Electroosmotic mobility</i>
GABA	<i>γ-Aminobutyric acid</i>
HPCE	<i>High performance capillary electrophoresis</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HEMA	<i>2-Hydroxyethyl methacrylate</i>
HEA	<i>2-Hydroxyethyl acrylate</i>
PIPPS	<i>Piperazine-N,N'-bis(3-propanesulfonic acid)</i>
NMR ¹³ C CP-MAS	<i>Nuclear magnetic resonance ¹³C cross-polarization magic angle spinning</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
TES	<i>Trietoxisilano</i>
THF	<i>Tetrahidrofurano</i>

RESUMEN

El presente trabajo de investigación hace parte de un proyecto mayor que busca contribuir a la solución del problema analítico asociado con la alta adsorción de solutos básicos como proteínas sobre las paredes internas de los tubos de sílica utilizados actualmente en CE, así como la insatisfactoria estabilidad hidrolítica de los recubrimientos orgánicos anclados sobre dichas superficies. En este trabajo se desarrolla una variedad de películas poliméricas hidrofílicas con el propósito de minimizar las fuertes interacciones entre proteínas y la superficie de la sílica. Dichas películas se anclan sobre tres tipos de sustratos de sílica: particulada, placas y tubos capilares. Se utilizó sílica particulada para estudios de IR y NMR, para estudios de superficie se emplearon placas de sílica, y para estudios CE se emplearon tubos capilares.

El anclaje de las películas poliméricas se llevó a cabo mediante la metodología de polimerización radicalaria de transferencia atómica, ATRP (por sus siglas en Inglés). Esta metodología requiere la inmovilización previa de un iniciador sobre la superficie de sílica, lo cual se hace mediante un procedimiento que involucra dos pasos. Primero se fijan moléculas de propanol sobre la superficie, y luego se esterifican estas con bromuro de 2-bromo-2-metilpropanoilo. Posteriormente, cuatro monómeros derivados del ácido acrílico (HEMA, HEA, AAE y AAP) se polimerizan sobre el iniciador.

Las películas poliméricas preparadas permitieron la separación exitosa de varias mezclas de proteínas, alcanzándose eficiencias próximas al millón de platos teóricos por metro y excelente reproducibilidad de los tiempos de migración. Los recubrimientos que exhibieron las mejores separaciones de biomoléculas fueron poliHEMA sin entrecruzamiento y AAP entrecruzado con bisacrilamida.

1. INTRODUCCIÓN

Electroforesis capilar es una técnica analítica que emplea un campo eléctrico para la separación de analitos dentro de tubos muy angostos. Esta técnica en la actualidad es una de las herramientas más versátiles y de más rápido desarrollo en las ciencias de separación. No obstante, todavía presenta inconvenientes en la estabilidad de los recubrimientos depositados sobre las paredes internas de los capilares de sílica cuando se exponen a pHs extremos. Aunque un buen número de investigadores ha desarrollado una variedad de métodos en la búsqueda de mejores recubrimientos, el problema de la estabilidad hidrolítica de estos es un tema de intensa investigación. El proyecto “madre” del presente trabajo se basa en un esquema que sustenta la estabilidad de la fase enlazada en la formación de enlaces Si-C y en el anclaje controlado de películas poliméricas hidrofílicas. Así, la finalidad del proyecto madre es la obtención de una fase estacionaria hidrofílica muy resistente a la hidrólisis que sea inerte a las interacciones con biomoléculas, especialmente proteínas.

El trabajo que se desarrolla en esta investigación logra la obtención de diferentes películas poliméricas derivadas de ésteres y amidas del ácido acrílico. Además se incorporan entrecruzantes apropiados a cada recubrimiento polimérico, con el fin mejorar el carácter inerte de la película hidrofílica. Al final se obtienen varios capilares recubiertos, que son empleados para el análisis de diferentes mezclas de proteínas a pH ligeramente ácido.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la solución del problema analítico asociado con la alta adsorción de solutos básicos como proteínas sobre las paredes internas de los tubos de sílica utilizados actualmente en CE, así como con la insatisfactoria estabilidad hidrolítica de los recubrimientos orgánicos anclados sobre dichas superficies.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar diferentes películas poliméricas hidrofílicas ancladas, vía ATRP, a la superficie interna de capilares y placas.

Caracterizar los nuevos recubrimientos, confirmando la presencia de grupos funcionales mediante técnicas espectrales (DRIFT y NMR ^{13}C CP-MAS), y evaluando características de superficie mediante técnicas microscópicas (AFM, SEM, elipsometría y perfilometría) y de ángulo de contacto.

Evaluar, mediante CE, la susceptibilidad de adsorción de los diferentes recubrimientos poliméricos en capilares con respecto a una variedad de proteínas.

3. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

3.1. HPCE COMO HERRAMIENTA ANALÍTICA

Técnicas analíticas como la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC, *high performance liquid chromatography*) han permitido la identificación, separación y cuantificación exitosa de millones de compuestos. Una técnica relativamente nueva, la electroforesis capilar de alto desempeño (CE o HPCE, *high performance capillary electrophoresis*), es actualmente una herramienta analítica de rápido desarrollo en las ciencias de separación. Su vertiginoso ascenso en popularidad es un resultado directo de los enormes beneficios que HPCE ofrece, como su rapidez y alta eficiencia, que permiten la separación de una amplia variedad de compuestos. Esto la ha convertido en una herramienta de gran interés especialmente en el campo de la bioquímica por sus numerosas aplicaciones en el análisis de aminoácidos, péptidos, proteínas, fragmentos de restricción del DNA, carbohidratos, vitaminas, ácidos orgánicos, polímeros, fármacos, tintes e, inclusive, partículas de virus y células enteras.¹⁻³ La rapidez, sensibilidad, versatilidad y bajos costos de análisis, hacen de HPCE una técnica muy atractiva para muchos científicos.

Se denomina “electroforesis” a la migración diferencial de partículas en un campo eléctrico. En un análisis típico por HPCE, un extremo del capilar (ver Figura 1) se sumerge en un reservorio que contiene solución *buffer*. El otro extremo del capilar se sumerge en la muestra de interés y, mediante una diferencia de presión o de voltaje, se inyecta un pequeño volumen de muestra (normalmente 1-500 nL). Este extremo del capilar se sumerge posteriormente en otro reservorio que contiene la misma solución *buffer* y posteriormente se aplica un potencial (típicamente, 10-30 kV) a través de electrodos de platino. La separación ocurre como resultado de las diferencias de movilidad electroforética de los analitos. El flujo electroosmótico, generado por el campo eléctrico, mueve la solución entera del ánodo hacia el

cátodo, permitiendo la detección de todos los solutos sin importar la carga, a medida que pasan por la ventana óptica del capilar. Un sistema de adquisición de datos en línea permite obtener el electroferograma del análisis realizado. La separación mediante electroforesis está basada en las diferencias de la velocidad de los solutos en un campo eléctrico, la cual se puede expresar como

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \tag{I}$$

donde

- v_{ep} velocidad del ion
- μ_{ep} movilidad electroforética
- E campo eléctrico aplicado

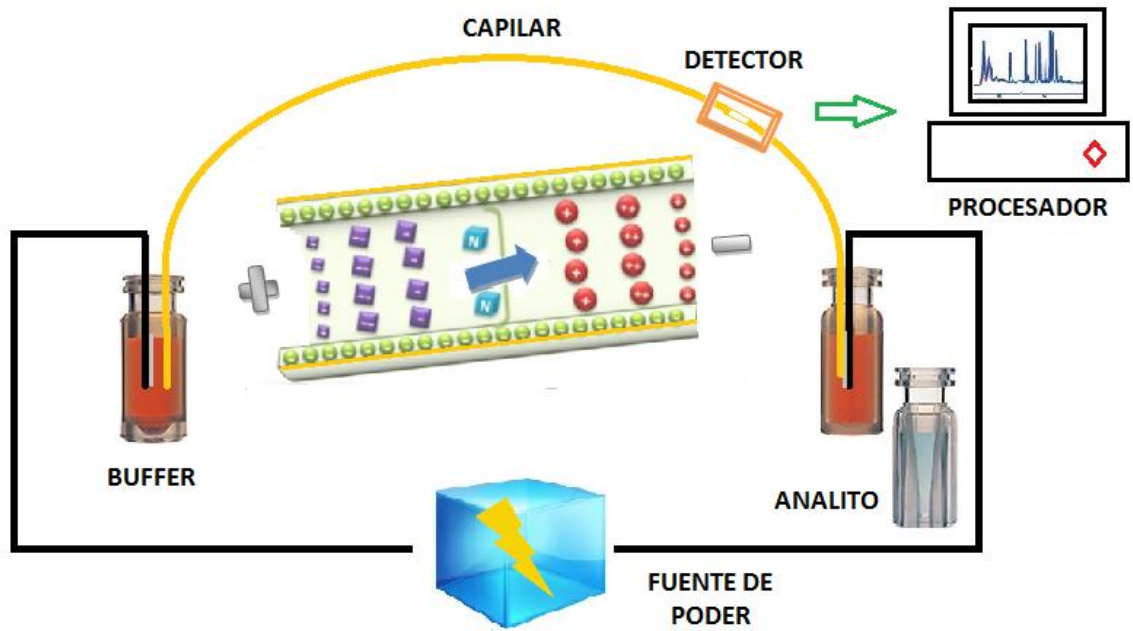


Figura 1. Esquema de un sistema simple para electroforesis capilar.

La movilidad electroforética de un ion determinado (en un medio dado) es una característica de dicho ion, siendo positiva para cationes y negativa para aniones, las especies neutras no poseen movilidad electroforética. La movilidad electroforética depende de la composición de la solución *buffer*, del potencial aplicado, del tipo carga y tamaño del ion. Durante una separación bajo condiciones constantes de flujo, los iones en movimiento experimentan fuerzas de fricción con el medio (solución), de tal manera que los más pequeños y altamente cargados poseen altas movilidades, mientras los más grandes y menos cargados poseen bajas movilidades.⁴

En CE, electroósmosis es el fenómeno de transporte del electrolito a través del tubo capilar, cuando entre los extremos de este se aplica un potencial eléctrico. Dicho flujo es consecuencia directa del potencial “zeta” originado por la distribución de cargas eléctricas en la interfase pared/solución (la “doble capa” descrita por las teorías de Gouy-Chapman y Stern⁵) en el interior del capilar de sílica. La velocidad electroosmótica (*electroosmotic velocity*, v_{eo}) se expresa mediante una ecuación similar a la ecuación I

$$v_{eo} = \mu_{eo}E \quad (II)$$

donde

μ_{eo} movilidad electroosmótica

E campo eléctrico

La movilidad electroosmótica (*electroosmotic mobility*, EOM) se determina tradicionalmente midiendo el tiempo que toma un marcador neutro en viajar la distancia inyección-detección, bajo la aplicación de un campo eléctrico. Este método, a pesar de su simplicidad, tiene la desventaja que, en flujos electroosmóticos bajos, las mediciones de EOM son muy lentas. En 1996 Sandoval y Chen desarrollaron un método para medir de forma rápida la EOM en tubos capilares.⁶ En el mismo año y de manera independiente Williams y Vigh

desarrollaron un método similar.⁷ Este último método se diferencia por la incorporación de tres inyecciones de marcador en lugar de dos como lo hicieron Sandoval y Chen. Los dos métodos, en relación con el tradicional, acortan el tiempo de medida y alarga la vida útil de la solución *buffer*, permitiendo múltiples medidas de la EOM sin cambio significativo del pH, que resulta de una lenta pero prolongada electrolisis de la solución. En este trabajo se adopta el método de William y Vigh con tres marcadores, porque resulta particularmente conveniente para flujos electroosmóticos positivos o negativos pequeños, sin tener conocimiento previo de su signo.

3.2. FASES ENLAZADAS PARA HPLC Y HPCE

Las sílicas químicamente modificadas han sido ampliamente usadas como soporte de separación en cromatografía. En CE la modificación química de la superficie de los tubos capilares se realiza principalmente con el fin de eliminar las interacciones entre la pared interna del capilar y los constituyentes de la muestra de separación, en especial, proteínas. Con este propósito, se han realizado numerosos estudios enlazando grupos orgánicos al sustrato de sílica.⁸⁻¹⁰ La idea es crear una barrera física entre la pared del capilar y la proteína. Dicha barrera debe ser completamente resistente al medio y a las condiciones de separación de los analitos y no debe interactuar con éstos. Sin embargo, estos requerimientos no se han cumplido completamente en la realidad.

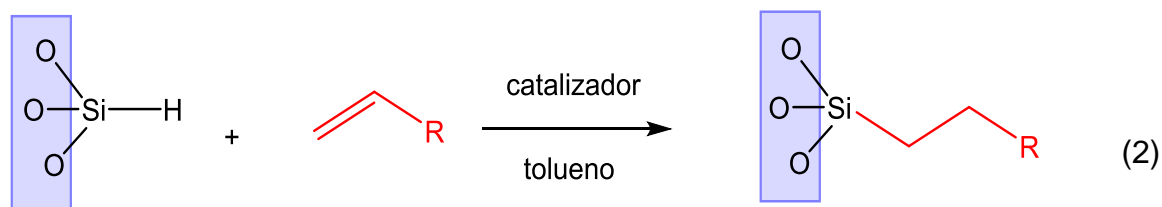
Para efectos de aplicación en análisis de proteínas por CE, los recubrimientos en la pared interna de los capilares deben ser de carácter hidrofílico. Aunque se han desarrollado muchos de estos recubrimientos, ellos presentan baja estabilidad hidrolítica a pHs relativamente moderados. Esta limitación es responsable de picos con largas colas y recuperación incompleta de solutos debido a las interacciones de estos con los grupos silanol, SiOH, remanentes (interacciones

“silanofílicas”).^{11, 12} La mayoría de las fases enlazadas comerciales para cromatografía de gases, cromatografía líquida y electroforesis capilar se producen mediante la reacción entre los grupos SiOH de la superficie de la sílica y un agente organosilano del tipo $R_{4-n}SiX_n$ (donde R es un grupo orgánico, X es un grupo fácilmente hidrolizable, usualmente cloruro, y n puede tomar valores entre 1 y 3)^{13, 14}

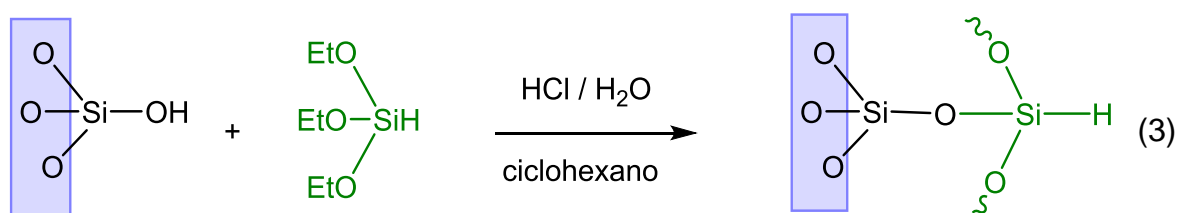


Esta metodología, aunque versátil y relativamente simple de implementar, padece de muchas deficiencias como la remoción incompleta de los grupos silanol, así como una alta susceptibilidad de ruptura del enlace Si-O-Si a pHs relativamente moderados. Este problema de baja estabilidad hidrolítica de las fases enlazadas ha recibido mucha atención en los últimos años, tanto para cromatografía líquida como electroforesis capilar.

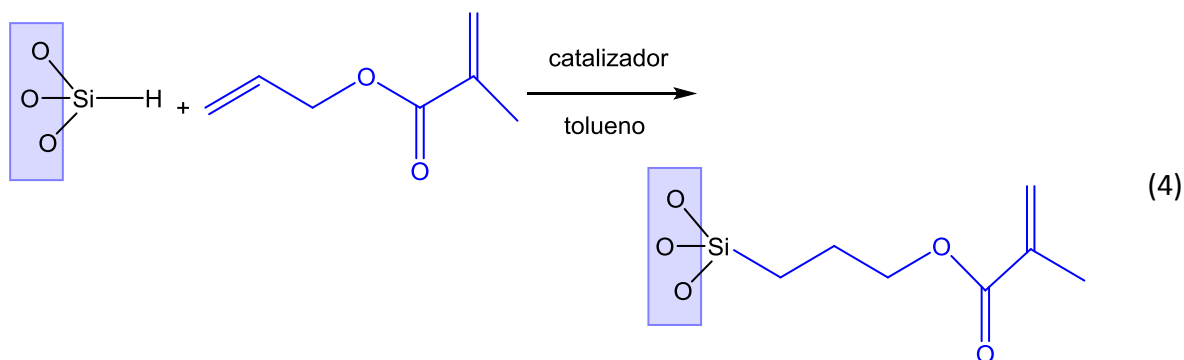
El proyecto madre del presente trabajo sigue un esquema sintético completamente distinto, que basa la estabilidad de la fase enlazada en la formación del enlace Si-C. Este enlace Si-C se reconoce desde hace tiempo como el más fuerte de las cadenas Si-O-Si-C presentes en las fases convencionales. Al final de la década de los 80s, Sandoval *et al.* desarrollaron una metodología para la formación de un enlace Si-C sobre sustratos de sílica, utilizando como reacción primaria la adición catalítica de hidruro de silicio a una olefina terminal (ver reacción 2), reacción conocida como “hidrosililación”.¹⁵



Claramente, el grupo SiH se enlaza previamente a la superficie de la sílica. La metodología que se sigue en la formación de este hidruro intermediario fue estudiada y reportada como parte del proyecto madre.¹⁶ La hidruración se hace mediante la reacción de los grupos silanoles de la superficie con una solución de trietoxisilano (TES) en tetrahidrofurano (THF) que contiene pequeñas cantidades de agua y HCl, y que ha sido posteriormente redisolta en una cantidad relativamente grande de ciclohexano.



La gran versatilidad del proceso de hidrosililación (reacción 2), se evidencia en la exitosa preparación de una variedad de fases, incluyendo 2-(metacriloxi)etil succinato,¹⁷ fullereno C60,¹⁸ colesterol,¹⁹ entre otros. El interés en esta investigación ha sido, y sigue siendo, utilizar la reacción de hidrosililación para inmovilizar una película polimérica a la pared interna de capilares de sílica. En el pasado, la reacción de hidrosililación ha permitido el anclaje de grupos γ -metacriloxipropil a la superficie de sílica, como se ilustra en la reacción



El grupo metacrililoil se copolimeriza con monómeros derivados de acrilamida generando superficies recubiertas con un polímero hidrofílico, útil para la separación CE de biomoléculas.²⁰ Esta metodología de polimerización se realiza

en presencia de peroxidisulfato de amonio como iniciador de radicales y tetrametiletilendiamina como catalizador. Como resultado, es un proceso no controlado que produce polímero tanto en el seno de la solución como en la superficie que sostiene los grupos metacrililoil. Puesto que la reacción de polimerización no se confina en la superficie, se termina taponando irreversiblemente la mayoría (> 50%) de los capilares sometidos a modificación.²⁰ De allí la necesidad de implementar un proceso alternativo que permita el crecimiento de películas poliméricas controladas y libres de taponamiento. El uso de métodos tradicionales de polimerización con radicales libres no produce el control de la estructura polimérica exigido por muchas aplicaciones modernas. Dichos requerimientos incluyen control de tamaño, baja polidispersidad (distribución estrecha de peso molecular), pocas ramificaciones, etc. Para obtener dichos polímeros con estructura y tamaño controlados se han desarrollado procesos basados en reacciones tales como ATRP (*atom transfer radical polymerization*), RAFT (*reversible addition-fragmentation chain transfer*), y SFRP (*stable free-radical polymerization*), etc. Estas metodologías no solo confinan la polimerización a la superficie, sino que la reacción ocurre de manera controlada, resultando una película de un espesor dado. Con este propósito se anclan primero grupos iniciadores de polimerización tales como el cloro bencilo²¹ y 2-bromo-2-metilpropionilo (2-bromo-2-methylpropionate, BMP),²² que permiten la polimerización de una amplia variedad de monómeros incluyendo vinilos.²³

El anclaje covalente de polímeros hidrofílicos a la superficie es una estrategia importante para minimizar las interacciones de proteínas con la pared de sílica dentro del tubo capilar.²⁴ La idea es crear una barrera física biocompatible entre las proteínas y los silanoles. El anclaje de películas poliméricas sobre superficies se ha llevado a cabo de dos maneras conocidas como “*grafting-to*” y “*grafting-from*”. El método *grafting-to* consiste en anclar un polímero preformado, cuya solución se pone en contacto con la superficie. La reacción de anclaje se da entre grupos activos en la superficie y en el polímero. Polímeros solubles en agua como

poli(vinil alcohol) y poli(etilenglicol) han sido usados con esta metodología.²⁴⁻²⁶ A pesar de su simplicidad experimental, la metodología *grafting-to* está limitada por un fuerte impedimento estérico que se hace mayor con el tamaño del polímero. El método *grafting-from* se basa en la polimerización *in-situ* desde la superficie previamente modificada con iniciadores. Entre los distintos procedimientos para *grafting-from* se destaca la polimerización radicalaria de transferencia atómica, ATRP, por su buen control sobre el peso molecular del polímero y su gran versatilidad en función de monómeros e iniciadores que pueden emplearse. Otro aspecto a resaltar tiene que ver con la “suavidad” de las condiciones de reacción, pues en la mayoría de casos la polimerización se lleva a cabo a temperatura ambiente en solventes semiacuosos.²⁷

ATRP fue desarrollada en 1995 por Wang y Matyjaszewski^{28, 29} y por Kato³⁰ de manera independiente y tiene un gran potencial para el desarrollo de nuevos materiales debido a su habilidad de controlar el peso molecular, la distribución de este (polidispersidad) y la arquitectura de los polímeros formados. El control de la reacción se basa en la disminución de la concentración de especies radicalarias activas evitando reacciones de terminación en el proceso de polimerización (ver Figura 2). De acuerdo al mecanismo general para ATRP, se establece un equilibrio dinámico entre el haluro de alquilo (o cadenas de polímero con halógenos terminales, RX) y el correspondiente radical R·, mediado por la transición ligando-metal ($Mt^n Y / \text{ligando} - Mt^{n+1} Y / \text{ligando}$).³¹ La tendencia de la reacción es hacia la izquierda (especies inactivas), lo que permite mantener concentraciones bajas de las especies radicalarias y las especies desactivadoras (complejo $Mt^{n+1} Y / \text{ligando}$). Esto se conoce como el “efecto persistente del radical”.³²

Se ha desarrollado una variedad de catalizadores a partir de complejos metálicos

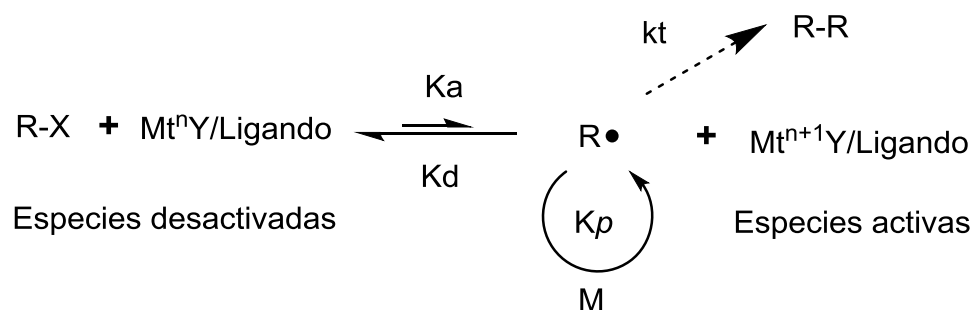


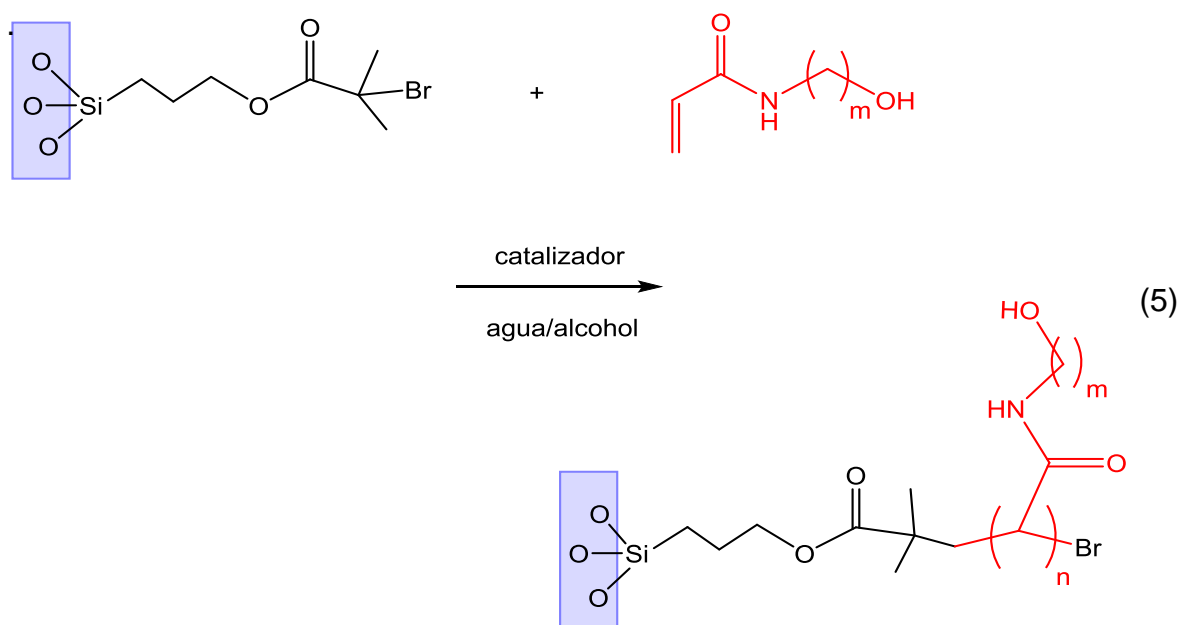
Figura 2. Esquema general para ATRP, donde K_a , K_d , K_p y K_t son las constantes de activación, desactivación, polimerización y terminación respectivamente, y M es el monómero.

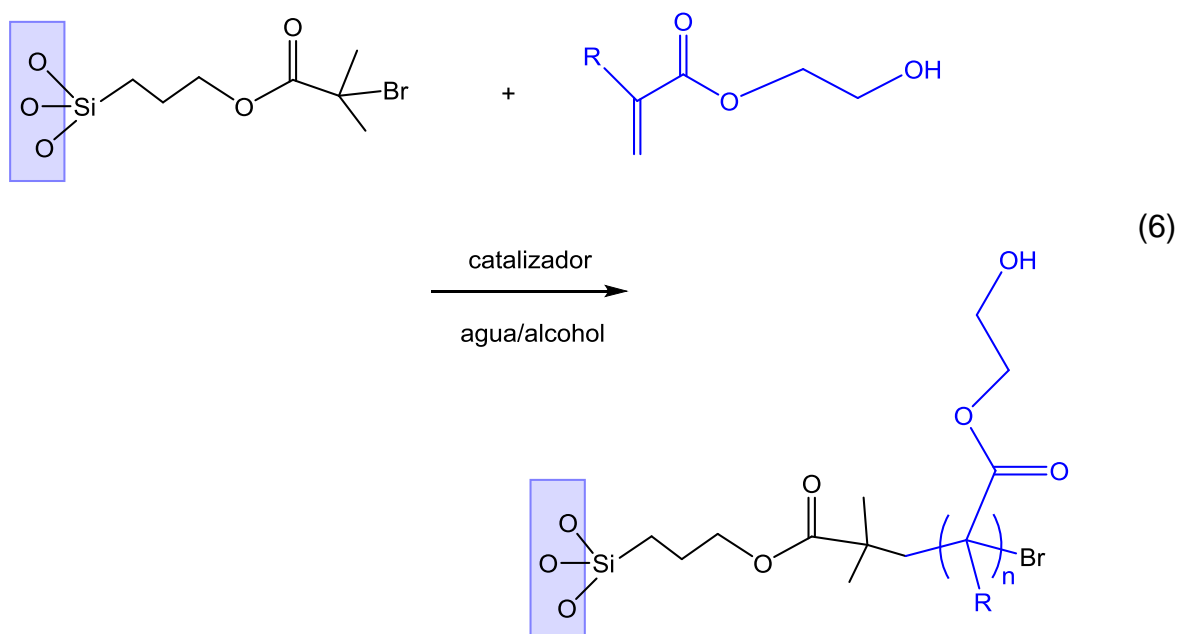
de cobre, hierro, cobalto, rutenio y níquel (usualmente como sales de iodo, bromo y cloro), con ligandos a base de nitrógeno o fósforo.³³⁻³⁵ La función del ligando es solubilizar el ion metálico, muy comúnmente cobre, y mantener el estado de oxidación del metal.³³

Wirth *et al.* fueron los primeros en reportar películas poliméricas para CE ancladas covalentemente vía ATRP.³⁶ Posteriormente muchas otras metodologías se han desarrollado con variedades de iniciadores y monómeros.³⁷⁻⁴⁰ Acrilamida (*acrylamide*, AA) ha sido el monómero más usado en recubrimientos para CE, a pesar de su limitada estabilidad a pH moderadamente alcalino.⁴¹ Derivados N-sustituidos de acrilamida como el N-acriloilaminoetanol, se han empleado en recubrimientos para CE con excepcional resistencia a la hidrólisis, proveyendo larga vida útil para los recubrimientos a pH alcalino.⁴² Derivados N-sustituidos como N-acriloilaminoetanol (*N-acryloylaminoethanol*, AAE) y N-acriloilaminopropanol (*N-acryloylaminopropanol*, AAP), podrían proveer recubrimientos poliméricos más estables e hidrofílicos que AA.^{38, 40} El carácter hidrofílico de un recubrimiento polimérico para CE es de vital importancia para la eficiencia de separación de proteínas, puesto que elimina o, al menos, minimiza la competencia entre la proteína y el agua por los sitios activos de adsorción sobre la superficie polimérica. El concepto de eliminar la adsorción (*fouling*) de materiales,

incluyendo proteínas, es el objeto de estudio en muchas áreas de investigación, en especial en la biomédica, donde el desarrollo de superficies poliméricas hidrofílicas *non-fouling* es de vital importancia.⁴³ El carácter hidrofílico y estable de los polímeros de AAE y AAP son las razones por las cuales se emplean en este trabajo. Además, estos monómeros tienen la ventaja sobre acrililaminoetanol que no polimerizan espontáneamente como lo hace este último, aún en presencia de inhibidor.⁴⁴

Otros monómeros, también derivados del ácido acrílico, son los ésteres metacrilato de 2-hidroxietilo (*2-hydroxyethyl methacrylate*, HEMA), y acrilato de 2-hidroxietilo (*2-hydroxyethyl acrylate*, HEA).^{43, 45, 46} Junto con los monómeros AAE y AAP (estos son amidas del ácido acrílico), HEMA y HEA fueron seleccionados en este trabajo para obtener películas poliméricas hidrofílicas *non-fouling* sobre capilares modificados con el iniciador BMP. Los procesos correspondientes se resumen mediante las reacciones 5 y 6 de abajo. En la reacción 5, $m = 2$ o 3 para las amidas AAE o AAP, respectivamente. En la reacción 6, $R = H$ o CH_3 para los ésteres HEMA y HEA, respectivamente. Debido a su carácter hidrofílico alto, se espera de todos ellos un comportamiento *non-fouling* de sus polímeros.





3.3. ESQUEMA SINTÉTICO DEL PRESENTE TRABAJO

En el presente proyecto se obtiene una variedad de películas poliméricas hidrofílicas confinadas a la superficie de sílica, mediante el esquema sintético que se resume en la Figura 3. Este trabajo considera tres importantes aspectos en la obtención de recubrimientos poliméricos para CE. (1) Un anclaje estable del iniciador, mediante el enlace Si-C, que se desarrolla vía hidrosililación sobre la superficie de sílica hidrurada. (2) Películas poliméricas estables e hidrofílicas con características *non-fouling*. (3) Un método de polimerización –ATRP– con fácil control del espesor de las películas poliméricas. Desafortunadamente, el iniciador anclado sobre la superficie involucró dos etapas de síntesis y no una, como inicialmente se planteó. Esto se debió a rendimientos insatisfactorios del iniciador anclado en un solo paso. Por razones de espacio, este documento no detalla ningún aspecto de este procedimiento. También es importante mencionar que únicamente el aspecto de la estabilidad hidrolítica no se evalúa en el presente trabajo.

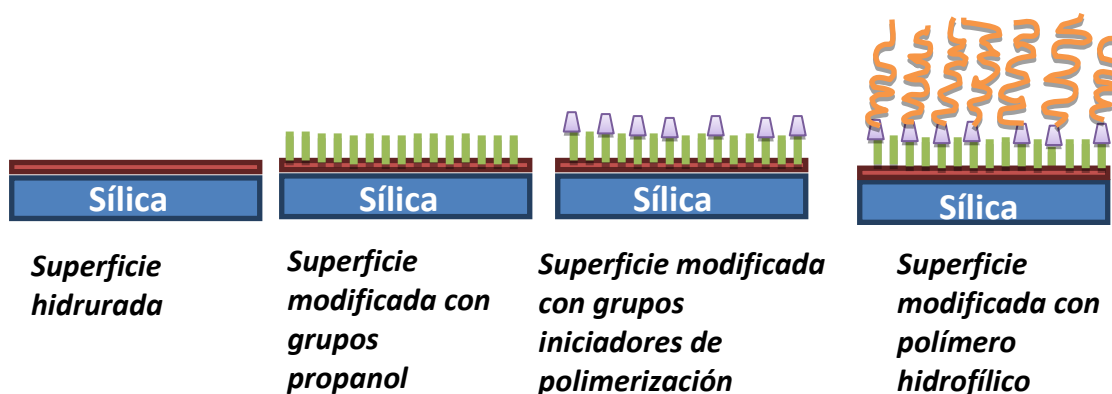


Figura 3. Esquema de modificación de sustrato de sílica para obtener recubrimientos hidrofílicos covalentemente anclados.

Con el fin de minimizar las interacciones de analitos con silanoles que se regeneran al exponer hidruros remanentes a soluciones acuosas, las películas poliméricas se entrecruzan mediante la simple adición del agente entrecruzante a la solución polimerizante.⁴⁷⁻⁵⁰ De esta manera se refuerza la barrera física sobre silanoles disociados, responsables de interacciones electrostáticas con proteínas (ver Figura 4). Nótese que cada monómero tiene su entrecruzante estructuralmente relacionado (*vide infra*, Figura 16). En este trabajo se entrecruza HEMA con EGDM (*ethylene glycol dimethacrylate*), HEA con EGDA (*ethylene glycol diacrylate*), AAE y AAP con Bis (*N,N'*-*methylenebisacrylamide*).

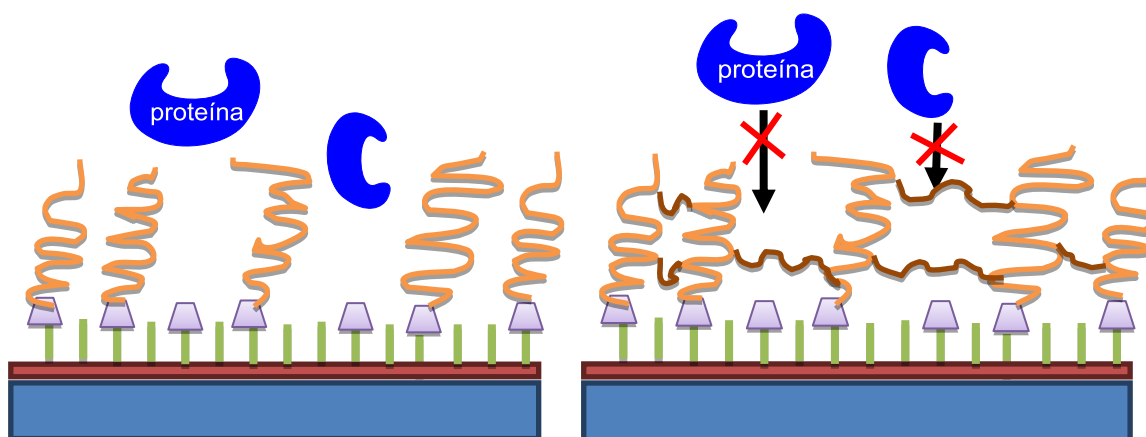


Figura 4. Esquema de polimerización vía ATRP sin y con entrecruzamiento.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. EQUIPOS

Todos los experimentos se llevan a cabo en dos instrumentos de electroforesis capilar, el primer equipo es un Agilent modelo 1600-3D CE System (U.S.) equipado con automuestreador de carrusel para 48 viales, sistema de vacío para lavados en doble dirección con 1 a 50 mbar o alta presión de 2 a 12 bar, sistema de inyección por presión (0 a 50 mbar) o electrocinésica (0 a 30 KV), y un sistema de detección ultravioleta/visible con arreglo de diodos (190-600 nm). La adquisición de datos se realiza mediante una interface 82357B USB/GPIB conectada a un PC con software de control y análisis HP Chemstation Rev. B. 03.0x. El segundo equipo es un Agilent modelo 7100-3D CE System (U.S.) con equipamiento similar al anterior, excepto que el sistema controlado de presión puede ir hasta 100 mbar. La adquisición de datos se realiza mediante una interface HP82341 USB/GPIB conectada a un PC con software de control y análisis HP Chemstation Rev. B-04-03-54. Para el tratamiento térmico durante la modificación de los capilares se utiliza el horno de un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890, al cual se le han extraído los sistemas de inyección y detección. Para la medición de ángulos de contacto sobre placas se emplea un goniómetro hecho en casa. Este se construye con la plataforma de un microscopio marca Leica Galen fuera de servicio, a la cual se le adapta un microscopio digital USB 2.0 (China) y una jeringa de 10 μ l Hamilton Corp. (U.S.). Los ángulos de contacto se calculan con el software de licencia libre, *Image J* versión 1.43, usando el *plug-in Drop-Analysis*, disponibles en el sitio *web* de National Institutes of Health y en el sitio *web* de la Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (Suiza).

Para determinar la rugosidad del recubrimiento sobre las placas se emplea un equipo de AFM Asylum Research modelo MFP-3D-SA (U.S.). Para la caracterización DRIFT de los sustratos de sílica particulada se emplea un espectrómetro Nicolet modelo 6700 FT-IR de Thermo Scientific (Alemania), equipado con un accesorio de reflectancia difusa. Para la determinación de cobertura de superficie se utiliza un analizador elemental FlashEA1112 de Thermo Inc. (U.S.). La caracterización NMR ^{13}C CP-MAS de sólidos se lleva a cabo con el espectrómetro de Bruker Advance II-400 MHz equipado con una sonda para sólidos Bruker MAS II (Alemania). Las imágenes de SEM se obtienen con un equipo modelo 7573 de Oxford Instruments (Inglaterra) en el laboratorio de microscopía electrónica de la Escuela de Ingeniería de Materiales de la Universidad del Valle. Para las mediciones de elipsometría se emplea un instrumento de fase modulada espectroscópica UVISEL 2; las mediciones se realizan en el laboratorio de Horiba Inc. Corp. (Francia). Para las mediciones de perfilometría se emplea el equipo modelo KLA Tencor D-120 (U.S.). Para la medición de pH se emplea un pH-metro CG 8-32, Nr 300512 (Alemania). Para la separación de solventes de sílica particulada se usa una centrífuga MSE-MINOR modelo 4-71 (Inglaterra).

4.2. MATERIALES

Los capilares de sílica (50 μm de diámetro interno, id) fueron obtenidos de Biotaq Inc. (U.S.) o Poymicro Technologies (U.S.). Placas de sílica con dimensiones 25.4 \times 9.0 \times 1.0 mm fueron compradas a Laser Optex Inc. (China). La sílica particulada NucleosilTM (7 μm de diámetro, 81.0 m^2/g o 5 μm diámetro, 66.1 m^2/g) fue obtenida de Macherey-Nagel (Alemania). La sílica particulada YMC GelTM (10 μm de diámetro y 287 m^2/g) fue comprada a YMC Co. (Japón). La sílica Vydac TP (15-20 μm de diámetro y 106.5 m^2/g) fue comprada a Grace (U.S.). Para la elaboración de la ventana óptica de los capilares se emplearon cuchillas de acero

obtenidas de VWR Scientific Products (U.S.). Para el corte preciso de los extremos de los capilares se empleó un cortador de diamante obtenido de Shortix™ (U.S.). Para el tratamiento y secado de los capilares se empleó nitrógeno seco obtenido de Cryogas (Colombia). Para el sistema de alta presión de los instrumentos CE, se empleó aire seco de Cryogas. Para eliminar el oxígeno de la solución polimerizante se usó helio grado 5.0 de Cryogas. En la limpieza de las placas se empleó detergente marca Micro manufacturado por International Products Corporation (U.S.). La filtración de las soluciones se realizó a través de membranas de 0.45 μm obtenidas de Millipore Corp. (U.S.) y membranas de teflón de 0.45 μm compradas a Sigma Aldrich (U.S.). Para la manipulación de soluciones o solventes en atmósfera inerte se emplearon jeringas *gas-tight* de diferentes volúmenes (0.5, 1, 2.5 y 5 mL) compradas a Hamilton Corp. (U.S.). Para la preparación de soluciones reaccionantes libres de oxígeno o humedad se empleó un *glove-bag* comprado a Sigma Aldrich.

4.3. REACTIVOS

Alcohol alílico, 1,3-divinil-1,1,3,3-tetrametildisiloxano (catalizador de Karstedt, 2 % Pt en Xileno), 2,5-di-terbutilhidroquinona, THF, ciclohexano, DMF, metanol, bromuro de 2-bromo-2-metilpropanoilo, cloruro de cobre, AAE, AAP, HEMA, HEA, Bis, EGDM, EGDA, biperidina, piridina, Me₆TREN, cloruro de tris-2,2'-biperidina rutenio (II), GABA, ácido láctico, cafeína, lisozima, citocromo C de equino y bovino, tripsina, α -quimotripsinógeno, ribonucleasa, tripsinógeno, angiotensina I y II, bradiquinina y oxitocina, fueron comprados a Sigma-Aldrich (U.S.); etanol y dimetilsulfóxido fueron comprados a Carlo Erba (Francia); PIPPS fue comprado a GFS Chemicals (U.S.), tolueno grado HPLC fue comprado a Mallinckrodt (U.S.), y TES fue comprado a Alfa Aesar (U.S.).

4.4. PROCEDIMIENTOS PARA MODIFICACIÓN DE SUPERFICIES

4.4.1. Secado de solventes

Solventes como THF, ciclohexano y tolueno, usados en la preparación de soluciones de TES y alcohol alílico, se ponen en contacto con sodio metálico para eliminar el agua y garantizar que la reacción de hidruración e hidrosililación se lleven a cabo sin hidrolizar los grupos SiH en solución y grupos SiH anclados, respectivamente. Los solventes se dejan en agitación con láminas delgadas de sodio durante 24 horas, y posteriormente se destilan.

4.4.2. Pretratamiento de placas y columnas capilares

La metodología empleada en el pretratamiento de capilares y placas es aquella desarrollada por Gómez y Sandoval.⁵¹ Brevemente, capilares de 6 m de longitud se tratan pasándoles una solución de NaOH 1M a 100 psi durante 3 horas, con posterior enjuague con agua desionizada a 80 psi por una hora. Posteriormente, para incrementar la población de silanoles, el capilar se trata con HCl 6M durante 1.5 horas con una presión de 100 psi a 90 °C, con posterior enjuague con agua desionizada a 80 psi por una hora. El secado se realiza con flujo de nitrógeno a 40 psi y 110 °C durante 2 horas. Este y otros procedimientos similares se realizan en el sistema que se ilustra en la Figura 5.

Las placas de sílica son tratadas mediante la misma metodología que se emplea en los capilares, excepto que se sumergen en un tubo de ensayo con la solución reaccionante.

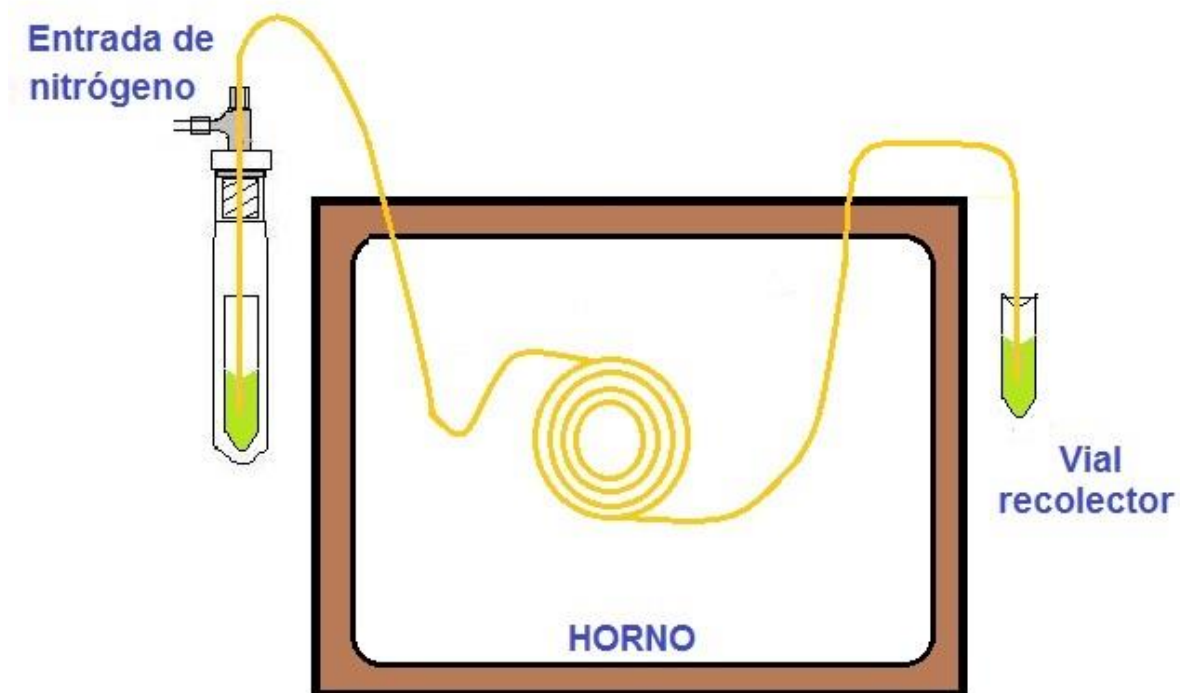


Figura 5. Sistema de modificación química de las columnas capilares.

4.4.3. Formación de hidruro sobre sílica

La hidruración de la sílica nativa que se realiza en esta investigación se basa en el trabajo realizado por Gómez y Sandoval.¹⁶ Para la hidruración de las placas y capilares, la solución reaccionante se obtiene por dilución (por un factor de 120) del hidrolizado (solución de TES, HCl, H₂O y THF) con ciclohexano. El procedimiento parte de la preparación de una solución *stock* 0.1M de TES en THF, bajo condiciones libres de humedad. Se prepara además una solución 1.7 M de HCl (6.32%). De estas soluciones se toman alícuotas adecuadas para obtener una solución hidrolizante 0.050 M en TES, 0.0050 M en HCl y 0.15 M en H₂O. Esta solución, que debe ser totalmente translúcida, se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente, se diluye 120 veces en ciclohexano y se filtra, después de lo cual queda con una relación molar de TES/SiOH de 420 para placas y 20 para

capilares. Si bien esta solución final para modificar placas y capilares tiene la misma concentración de reactivos, el volumen de dicha solución requerido para sumergir la placa en ella es de 4 mL, mientras lo que pasa por el capilar es de solo unos pocos microlitros. Esta es la causa de la notable diferencia en las relaciones molares descritas.

La reacción de formación de hidruro sobre sílica nativa procede durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas de sílica se ponen en contacto con la solución reaccionante bajo agitación, mientras los capilares se tratan pasándoles la solución reaccionante a una presión de 100 psi (lo cual resulta en un flujo de 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ para un tubo capilar de 50 μm de diámetro interno y 6 m de longitud). Los lavados se realizan con tres porciones de 3 mL de THF para las placas y flujo continuo a 80 psi durante 30 minutos para los capilares. Finalmente, el secado se realiza durante 2 horas a 110 $^{\circ}\text{C}$, con un flujo de nitrógeno a 40 psi en el caso de los capilares.

4.4.4. Hidrosililación

La reacción se lleva a cabo en placas, capilares y sílica particulada previamente hidrurados, los cuales se exponen a una solución que contiene alcohol alílico 2.0 M, 5000 ppm de 2,5-di-terbutilhidroquinona como inhibidor de radicales libres y 0.25 mM de catalizador de Karstedt en tolueno como solvente. La reacción procede durante 24 horas a 85 $^{\circ}\text{C}$. La solución reaccionante se prepara dentro un *glove-bag* en atmósfera de nitrógeno. Cada placa es sumergida en 4 mL de la solución reaccionante, mientras que a los capilares (6 m x 50 μm) se aplica una presión de nitrógeno de 14 psi para empujar la solución. Comúnmente se preparan 4 mL de solución reaccionante para modificar los capilares. La solución se somete a 75 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos (tiempo de inducción) antes de pasar por los mismos. El flujo medido es de unos 40 $\mu\text{L}/\text{h}$ para el capilar. La modificación de

sílica particulada se realiza conservando un volumen de solución reaccionante por masa de sílica de 10 mL/g.

4.4.5. Esterificación de la sílica modificada con propanol

La reacción de esterificación del sustrato modificado con propanol, se lleva a cabo durante 6 horas con bromuro de 2-bromo-2-metilpropanoilo 0.25 M en DMF como solvente (previamente secado con tamices moleculares) y piridina 0.25 M como base para neutralizar el HBr producido en la reacción. La solución reaccionante se prepara dentro de un *glove-bag* en atmósfera de nitrógeno. Cada placa se modifica con 4 mL de la solución reaccionante. De igual manera, para la modificación de capilares (6m x 50 μ m) se preparan 4 mL de solución que son empujados a 80 psi de nitrógeno, lo cual resulta en un flujo promedio de unos 60 μ L/h. Para la reacción que se lleva a cabo en sílica particulada se mantiene el volumen de solución reaccionante por masa de sílica en 10 mL/g.

4.4.6. Polimerización

La reacción ATRP se lleva a cabo sobre sustratos de sílica, previamente modificados con el iniciador BMP, durante 3 horas a temperatura ambiente. Las reacciones se efectúan en mezclas acuosas de metanol o etanol. En todas las reacciones es necesario degasar los solventes utilizados, mediante el burbujeo con helio por 15 min, eliminándose el oxígeno que podría oxidar el catalizador de cobre (I). Adicionalmente, la polimerización se lleva a cabo en atmosfera de nitrógeno dentro de un *glove-bag*.

La polimerización de HEA, AAE y AAP es catalizada por Me₆TREN-cobre (1:1) 20 mM en etanol:agua (4:1 v/v). El catalizador se prepara a partir de un *stock* de Me₆TREN 100 mM, del que se toma la cantidad necesaria para obtener un 25% de

exceso de cloruro de cobre (I), el cual se pesa previamente. Una vez se mezcla el CuCl con la solución de Me₆TREN, se filtra para eliminar el cobre sin acomplejar y se adiciona al monómero. Adicionalmente, para la incorporación de entrecruzante en la película polimérica se prepara un *stock* del entrecruzante que es 15 mg/mL en agua para Bis y 7.5 % v/v en etanol:agua (1:1) para EGDA. Debido a la baja solubilidad de los entrecruzantes en el componente orgánico, este *stock* contiene una mayor proporción de agua, ajustándose al final la cantidad de etanol necesaria para mantener la relación etanol:agua deseada. El volumen típico de solución reaccionante que se emplea para la modificación de capilares (2 m x 50 μm) es de 2 mL. La polimerización de sílica particulada se realiza con AAE y HEA, guardando una relación volumen/masa de 10 mL/g. Para la polimerización de AAE sobre placas se emplea un volumen de 4 mL de solución reaccionante, el cual mantiene la placa completamente sumergida en el líquido.

La polimerización de HEMA utiliza bipyridina-cobre (2:1) como catalizador y metanol:agua (1:1) como solvente. Al igual que en la polimerización antes descrita, se prepara un *stock* del ligando, en este caso bipyridina 300 mM, del que se toma la cantidad necesaria para reaccionar con la masa de cloruro cobre (I), previamente pesada. La polimerización utiliza un exceso molar del ligando para desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo, bipyridina-cobre [Cu^I(bpy)₂]⁺. El volumen típico del *stock* de catalizador que se prepara es de 2 mL, el cual se filtra en atmósfera de nitrógeno. La concentración final del catalizador [Cu^I(bpy)₂]⁺ es de 20 mM. Posteriormente se mezcla el catalizador preparado con la cantidad de HEMA correspondiente y se completa con el solvente. Para la incorporación del entrecruzante EGDM se prepara un *stock* 8 % v/v en metanol, posteriormente se adiciona la cantidad de agua necesaria para mantener la proporción deseada. El volumen típico de solución reaccionante que se emplea para la modificación de capilares (2 m x 50 μm) es de 2 mL. Para la modificación de sílica particulada se mantiene la relación volumen/masa de 10 mL/g.

4.5. PROCEDIMIENTOS PARA EVALUACION DE CAPILARES Y PLACAS

4.5.1. Ángulos de contacto

Se ha demostrado que el ángulo de contacto de una gota de agua depositada sobre una placa es una medida indirecta de su hidrofobicidad.¹⁶ Debido a su sencillez, esta técnica se emplea para la caracterización de superficies hidruradas y propanoladas. Todas las mediciones de ángulos de contacto se realizan con un goniómetro hecho en nuestro laboratorio (ver Figura 6). Gotas de 6 μL de agua se depositan desde una jeringa de 10 μL en tres sitios diferentes de la placa bajo estudio. Del procesamiento de la imagen de la gota se obtiene el ángulo entre la superficie del sustrato y la tangente al contorno de la gota. Un total de tres mediciones se obtienen por placa modificada.



Figura 6. Goniómetro construido en el laboratorio de Separaciones Analíticas de la Universidad del Valle.

4.5.2. Medición de movilidad electroosmótica

Las medidas de movilidad electroosmótica se realizaron aplicando una adaptación al método acelerado de Williams y Vigh.⁷ La Figura 7 describe el protocolo que se emplea en la medición de la movilidad electroosmótica con este método. A) Inicialmente se realiza el enjuague del capilar con el electrolito. B) Se hace una inyección neumática de marcador neutro (DMSO) durante un tiempo t_{inj} . C) Se aplica una diferencia de presión ΔP durante un tiempo dado para movilizar el marcador una cierta distancia. D) Se realiza una segunda inyección del marcador idéntica a la primera. E) Se moviliza el segundo marcador una distancia igual a la anterior. F) Se aplica una diferencia de potencial eléctrico, V , por un período de tiempo, t_v , para mover electroosmóticamente los marcadores una distancia Δl . G) Se inyecta un tercer marcador de igual manera a los anteriores. H) Se aplica la misma diferencia de presión ΔP para movilizar los marcadores hasta alcanzar la ventana de detección, y se registran los tiempos de movilización de los tres marcadores.

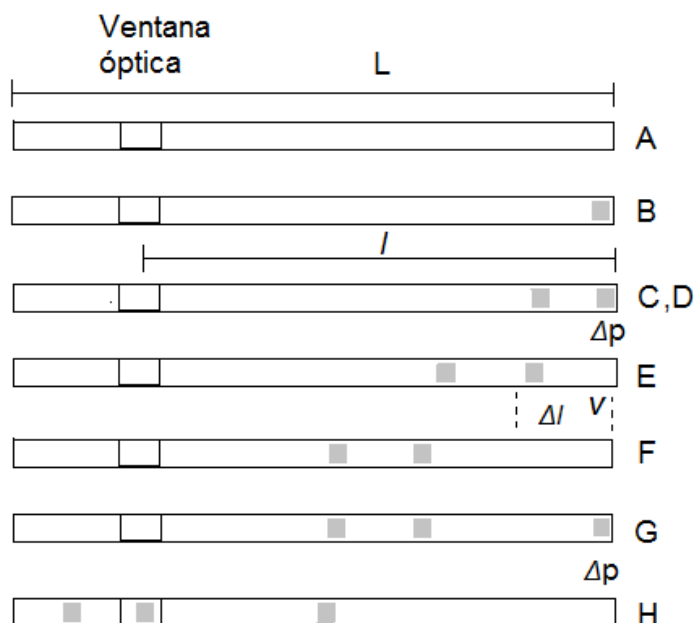


Figura 7. Esquema que ilustra el protocolo utilizado para medir la electroosmosis por el método acelerado.

En un experimento típico de medición de EOM, las inyecciones del marcador se realizan aplicando una diferencia de presión de 50 mbar por un período de 3 segundos. La presión de movilización entre marcadores es la misma que la inyección, pero por un período de 15 segundos. El potencial eléctrico aplicado es 10 kV por 3 minutos. El registro de la señal del detector a 210 nm se inicia con la última movilización neumática. La ecuación 3 detalla el cálculo de movilidad electroosmótica para tres marcadores.

$$\mu_{eo} = \frac{L \cdot l}{V \cdot t_v} \left(\frac{t_3 - 2t_2 + t_1}{t_3 + \frac{1}{2}t_{inj}} \right) \quad (III)$$

donde

L	longitud total de capilar
l	longitud efectiva
t_{inj}	tiempo de inyección del marcador neutro
t_{1-3}	tiempos de migración del marcador neutro
V	potencial aplicado
t_v	tiempo de aplicación de potencial

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. SÍLICA MODIFICADA CON GRUPOS PROPANOL

5.2.1. Caracterización espectroscópica

La adición selectiva del grupo hidruro de silicio sobre el doble enlace (ver reacción 7) se confirma mediante DRIFT (por sus siglas en Inglés, *diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy*) y NMR ^{13}C CP-MAS (*nuclear magnetic*

resonance ^{13}C cross-polarization magic angle spinning). La Figura 8 muestra los espectros DRIFT para la sílica hidrurada y luego modificada con propanol (sílica “propanolada”). Puede notarse como la intensidad de la banda de estiramiento del enlace Si-H a 2200 cm^{-1} claramente disminuye a medida que la reacción de hidrosililación progresa, lo cual se evidencia por la aparición de bandas de estiramiento C-H (2850 cm^{-1}) en la sílica propanolada.

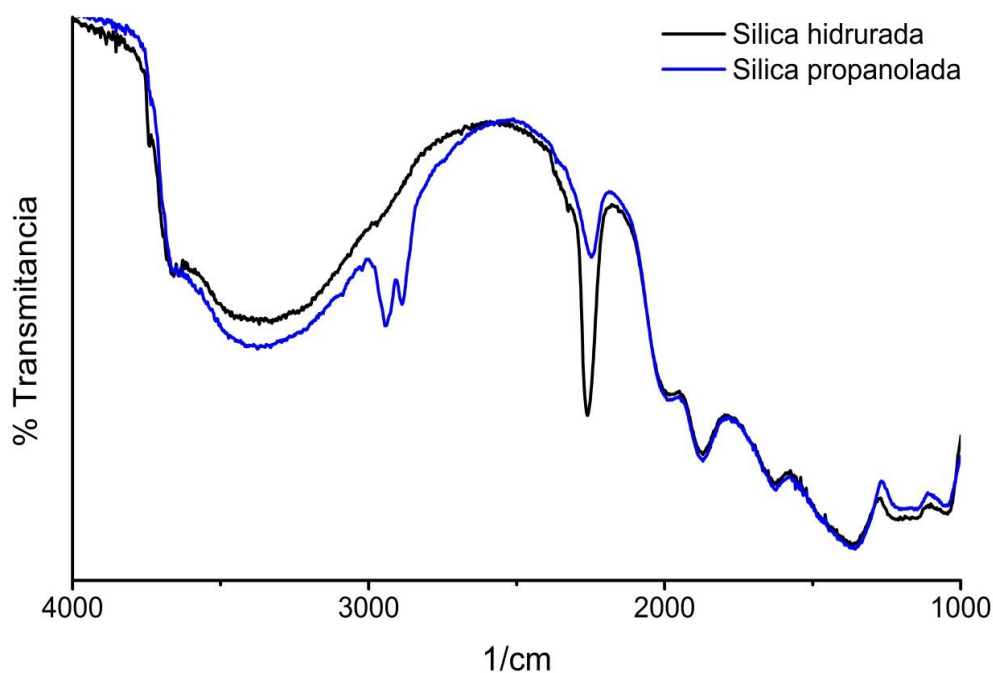
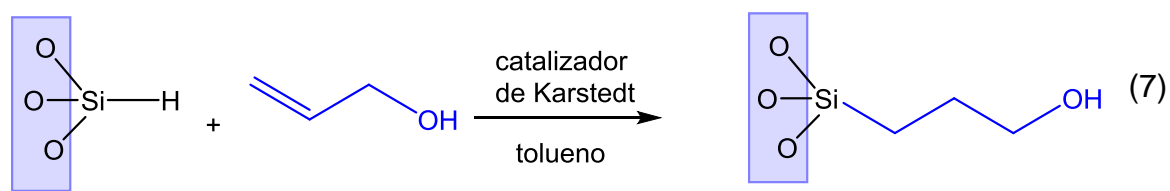


Figura 8. DRIFT de sílica (Nucleosil™) hidrurada y modificada con propanol.

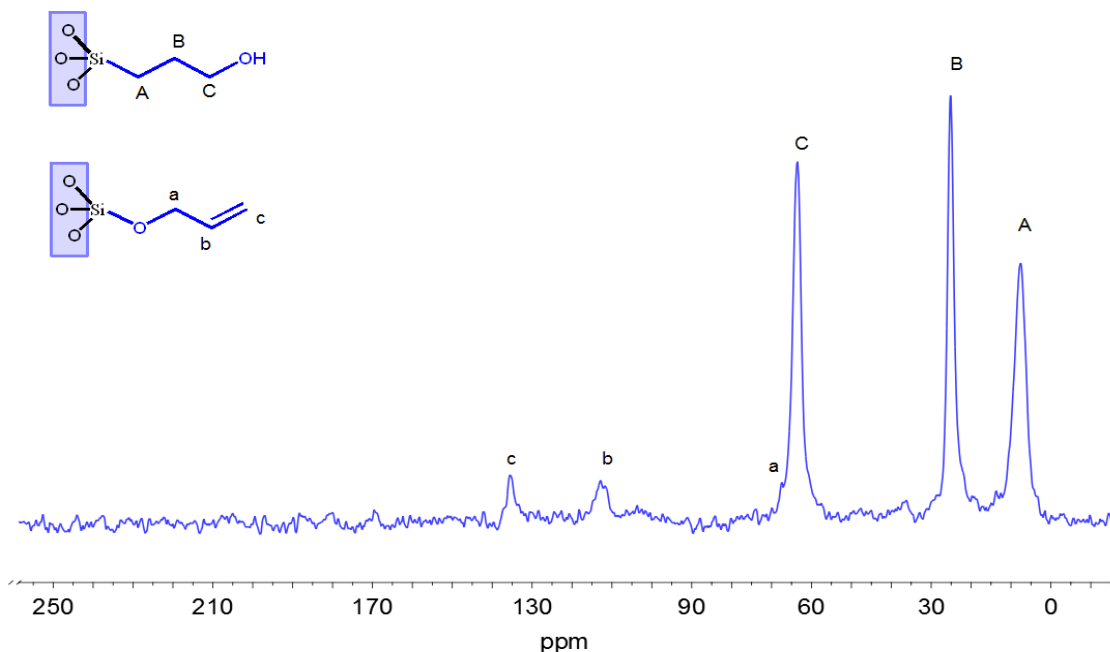


Figura 9. NMR ^{13}C CP-MAS de sílica (NucleosilTM) modificada con propanol.

El espectro de NMR ^{13}C CP-MAS de sílica modificada con propanol (ver Figura 9) muestra señales de alta intensidad para el grupo propanol anclado al sustrato de sílica por el átomo de carbono (“sililación-C”, estructura de carbonos marcados con letras mayúsculas en la Figura 9). Las señales entre 110 y 140 ppm de baja intensidad se deben a los carbonos del doble enlace del alcohol alílico anclado vía “sililación-O” (como se indica mediante la estructura de carbonos marcados con letras minúsculas). La relación de las áreas de dichas señales muestra que alrededor del 94% del proceso ocurre vía “sililación-C”. Este resultado es consistente con el reporte de la reacción, vía hidrosililación, del alcohol alílico con compuestos silsesquioxanos.^{52, 53}

Los silsesquioxanos son compuestos moleculares que han sido estudiados como modelos para sílica amorfa debido a su similitud estructural. Estos compuestos presentan una red de enlaces Si-O organizados en forma de jaula y con fórmula general $(\text{RSiO}_{3/2})_n$ ^{54, 55} donde R puede ser hidrógeno, grupos alquilo o arilo. Los

silsesquioxanos cúbicos ($n = 8$) no solo sirven como modelos para explicar el comportamiento de la sílica amorfa, sino que además predicen nuevas reacciones, como la del caso que nos atañe (reacción 7). La reacción de octakis(dimetilsiloxi)-octasilsesquioxano, $Q_8M_8^H$, ($R = HSiMe_2O$) con alcohol alílico da como producto exclusivo octakis(3-hydroxypropyldimethylsiloxy) octasil sesquioxano (C-sililación), lo cual predice que la sílica amorfa debería exhibir un comportamiento similar, como lo demuestra la Figura 9.⁵²

Cuando se hace el seguimiento en el tiempo de la cobertura (Γ_{PrOH}) que resulta de la reacción de hidrosililación a $85\text{ }^\circ\text{C}$ ⁵⁶ se observa que, después de unas 12 horas de reacción, la cobertura empieza a alcanzar un *plateau*, por lo que se consideró que 24 horas es un tiempo suficiente para la misma. Cabe resaltar que tiempos y temperaturas superiores de reacción conducen a la reducción del platino del catalizador como Pt(0), incrementando además la probabilidad de polimerización del alcohol alílico.⁵⁷ En la Tabla 1 se muestran coberturas típicas sobre micropartículas de sílica YMCTM ($10\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro y $287\text{m}^2/\text{g}$) y NucleosilTM ($5\text{ }\mu\text{m}$ diámetro, $66.1\text{ m}^2/\text{g}$) correspondientes al anclaje de propanol a $85\text{ }^\circ\text{C}$ y durante 24 horas de reacción. Las coberturas son calculados a partir del porcentaje de carbono, usando las ecuaciones reportadas por Sandoval.⁵⁸ Puede notarse como aumenta la densidad de los grupos propanol anclados a medida que decrece el área de la sílica, fenómeno que puede ser atribuido al menor impedimento estérico asociado con grupos anclados en poros más grandes. Siguiendo este patrón, puede decirse que sería razonable esperar recubrimientos superiores sobre capilares o placas de sílica plana (materiales no porosos).

Después de 24 horas de reacción las coberturas sobre sílica son superiores a las obtenidas con otras fases (típicamente $3.5 \pm 1\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2$).^{8, 15} Este hecho podría sugerir que existe alguna polimerización del alcohol alílico sobre la superficie generando grupos hidroxilos (OH) sobre el esqueleto de cadenas de carbonos anclados.⁵⁹ Esta polimerización no se considera un problema significativo, ya que

Tabla 1. Cobertura (Γ_{PrOH}) sobre sílica NucleosilTM y YMCTM

	Cobertura Γ_{PrOH} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Tamaño de poro (nm)
Nucleos TM	5.7	30
YMC TM	3.3	12

en principio todos los grupos OH podrían ser esterificados con bromuro de 2-bromo-2-metilpropanoilo y formar grupos iniciadores de polimerización, BMP, sobre la superficie (ver Sección 5.2, más adelante).

Asumiendo que los grupos anclados siguen un empaquetamiento planar hexagonal se puede estimar la distancia promedio entre dos grupos propanol a partir de los datos de cobertura.⁶⁰ Cálculos sencillos de conversión conducen a la siguiente ecuación:

$$\Gamma_{PrOH} \left(\frac{\text{grupo}}{\text{nm}^2} \right) = 0.602 \times \Gamma_{PrOH} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{nm}^2} \right) \quad (\text{IV})$$

El inverso de esta expresión produce el área seccional promedio (A_m) ocupada por un grupo anclado en nm^2 .

$$A_m \left(\frac{\text{nm}^2}{\text{grupo}} \right) = \left[\Gamma \left(\frac{\text{grupos}}{\text{nm}^2} \right) \right]^{-1} \quad (\text{V})$$

Mediante el modelo planar hexagonal de empaquetamiento puede demostrarse que A_m se puede expresar en función de la distancia entre dos grupos (l):

$$A_m = \frac{3\sqrt{3}}{8} l^2 \quad (\text{V})$$

De donde se deduce fácilmente que

$$l(\text{nm}) = \frac{1.241}{\sqrt{\Gamma_{PrOH}}} \quad (\text{VII})$$

La cobertura de grupos propanol sobre sílica Nucleosil™ (tamaño de poro grande de $5.7 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ corresponde a 3.4 grupos por nm^2 que a su vez corresponde a un área seccional promedio de 0.29 nm por grupo. La distancia promedio entre dos grupos propanol es de 0.67 nm, esta distancia entre dos grupos es bastante menor que la menor dimensión de una proteína como lisozima, cuando se mira globalmente como se muestra en la Figura 10.⁶¹ La lisozima es una de las proteínas estudiadas en este trabajo y sobre la cual se ampliará en la siguiente sección. Es importante el hecho de que una película anclada sea lo suficientemente densa en grupos o cadenas para impedir que una proteína interactúe con los silanoles remanentes.

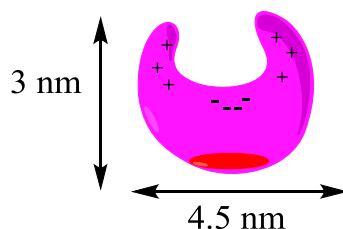


Figura 10. Representación esquemática de lisozima, de acuerdo con la referencia 62.

5.2.2. Hidrofilicidad

La humectabilidad de la superficie de sílica modificada se mide mediante el ángulo de contacto de agua sobre placas (*water contact angle*, WCA). Esta es una prueba indirecta de la modificación de la superficie. La Tabla 2 compara los valores del WCA de tres superficies: 1) placa pre-tratada o no modificada (ver sección 4.4.3), 2) placa hidrurada y 3) placa modificada con grupos propanol.

Como se espera, la superficie hidrurada mostró la más alta hidrofobicidad¹⁶ (mayor WCA) mientras que las demás, incluyendo la superficie propanolada, exhiben menor hidrofobicidad, comparables entre sí. En la Tabla 2 también se muestra el cambio sufrido por la superficie hidrurada después de ser expuesta por 1 hora a la solución *buffer* 25 mM PIPPS (por sus siglas en inglés, *piperazine-N,N'-bis(3-propanesulfonic acid)*). El nuevo ángulo de contacto de la superficie hidrolizada es comparable también con aquel de la superficie no modificada. Este hecho deja ver la susceptibilidad de hidrólisis del hidruro de silicio para regenerar una superficie similar a la de la sílica nativa, y dejando sitios potencialmente activos para la adsorción de proteínas.

Tabla 2. Datos de ángulos de contacto y EOM en placas y capilares respectivamente

Sustrato/propiedad	Placas	Capilares ^a
	WCA±DE (n=3)	EOM±DE (n=3) × 10 ⁻⁸ , m ² V ⁻¹ s ⁻¹
Nativo	35±8	0.57±0.01
Hidrurada	60±2	–
Hidruroidrolizado	40±7 ^b	1.38±0.06
Propanolado	45±1	0.67±0.04

^aTodos los tubos capilares (longitud total de 35.0 cm, longitud efectiva de 26.5 cm, 50 µm de id) fueron acondicionados con *buffer* PIPPS 25 mM con pH 4 durante 1 hora a 7 bar. Condiciones CE: inyección hidrodinámica (3 s a 50 mbar) de 10 mM de DMSO como marcador neutro en la solución de electrolito, voltaje aplicado de 28,0 kV (18 µA) durante 5.0 min, movilización hidrodinámica a 50 mbar, detección a 215 nm, enjuague con electrolito por 1 min entre corridas. ^bPlaca hidrurada tratada con el mismo *buffer* que contiene 1% v/v de THF durante 1 h con agitación suave.

5.2.3. Caracterización CE

El estudio CE en capilares también se realiza a pH 4 al cual, aunque solo una fracción de silanoles está ionizada, estos continúan siendo responsables de la

electroósmosis residual exhibida por dichos capilares. Los valores de EOM pueden asociarse con la efectividad del recubrimiento, pues valores altos de ella se corresponden a una mayor concentración de silanoles no modificados. La Tabla 2 agrupa también los valores de electroósmosis para tres sustratos modificados de sílica. Nótese que, a pesar que del buen recubrimiento con grupos propanol, aún quedan silanoles remanentes sobre la superficie, y a tal punto que la electroósmosis se hace comparable al capilar no modificado. Sin embargo, cabe destacar que el capilar nativo (tratado con NaOH y HCl) exhibe menos ionización a pH 4, como se ha reportado recientemente.⁵¹ Por otro lado, el capilar hidrurado y posteriormente hidrolizado con *buffer* muestra un incremento sustancial de electroósmosis comparado con el no modificado, debido a la extensa regeneración de SiOH, producto de hidrólisis del hidruro, SiH. Este mismo fenómeno ocurre en el capilar propanolado, en el que los grupos SiH no modificados –que yacen debajo de los grupos propanol anclados– son ahora hidrolizados, contribuyendo así al aumento de electroósmosis.

Este estudio CE también involucra el análisis del perfil de separación de piridina y cafeína, dos bases orgánicas frecuentemente utilizadas como sondas moleculares. La piridina ($pK_a = 5.14$) tiene carga positiva a pH 4, por lo cual es susceptible a interacciones iónicas con grupos silanoles deprotonados; no así la cafeína ($pK_a = 0.61$) que, al no estar cargada, es susceptible a interacciones tipo enlace de hidrógeno con silanoles no disociados. La Figura 11 muestra los perfiles CE de cafeína y piridina en los tres capilares antes mencionados. Puede observarse como la piridina presenta tiempos de migración muy similares en los tres capilares, mientras la cafeína presenta gran variación. Con el fin de obtener información del comportamiento de las moléculas analizadas sobre la superficie modificada, en el recuadro de la Figura 11 se muestra la velocidad electroforética de las dos bases corregida por la respectiva electroósmosis de cada capilar.

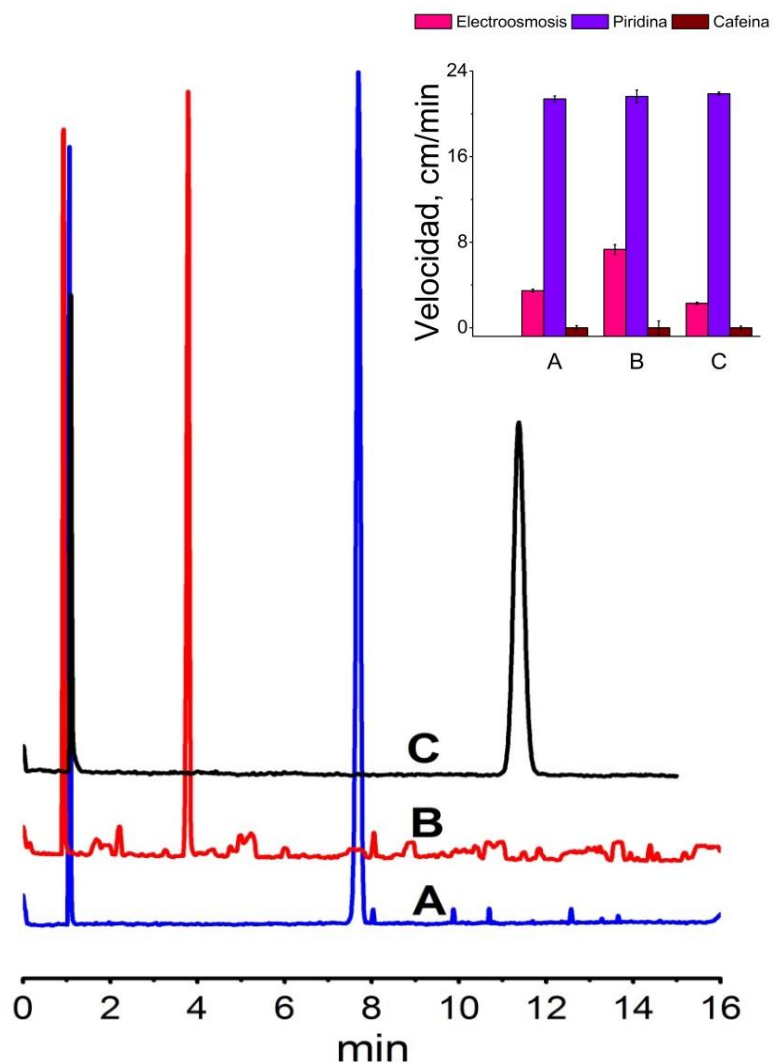


Figura 11. Electroferogramas típicos de piridina y cafeína (último pico) sobre capilar (A) no modificado, (B) hidrurado e hidrolizado, y (C) propanolado. Todos los capilares (provenientes del mismo lote) tienen una longitud total de 35.0 cm y 26.5 cm de longitud efectiva. Los capilares (50 μm Id) se acondicionaron con el electrolito (*buffer* 25 mM PIPPS pH 4.03) durante 1 hora a 7 bar. Condiciones CE: inyección hidrodinámica (3 s a 50 mbar) de piridina 4 mM y cafeína 2 mM en electrolito, potencial aplicado de 28.0 kV (18 μA), detección a 215 nm, enjuague con electrolito por 1 min entre corridas. El recuadro muestra las velocidades de banda para cada soluto corregidas por electroósmosis. También se incluye la velocidad electroosmótica como referencia.

Nótese que la velocidad electroforética de la piridina es fundamentalmente la misma en los tres capilares. Aunque este resultado no está en concordancia con la correspondiente electroósmosis, la ausencia de interacciones de intercambio iónico entre la piridina y el contra-ión de los silanoles (negativos) puede atribuirse a la alta hidrofiliidad de ésta (la piridina es soluble en agua en todas las proporciones). La cafeína, al ser menos soluble en agua y no tener carga a pH 4, brindaría la posibilidad de interacciones tipo puente de hidrógeno con la superficie; sin embargo, como se observa en el recuadro su movilidad electroforética es cercana a cero en los tres capilares. Es notable el hecho de que ninguno de los tres capilares bajo estudio presentó algún tipo de interacción importante con piridina y cafeína, lo cual es consistente con la forma simétrica de los picos en la Figura 11.

Con el fin de obtener una evaluación más completa de la tendencia a la adsorción sobre estos materiales, se emplean otras dos sondas moleculares para exploración de la superficie, el complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y la proteína lisozima. Aunque las dos cargas del complejo lo hacen altamente susceptible a interacciones de intercambio iónico, la lisozima es mucho más compleja (ver Figura 10) y puede exhibir intercambios catiónico y aniónico, así como interacciones tipo puente de hidrógeno, hidrofóbicas, van der Waals, etc. La Figura 12 muestra los perfiles electroforéticos de estas dos sondas moleculares en función de su concentración y de la naturaleza química de la pared interna de los capilares (Información detallada de áreas corregidas y asimetrías se muestra en el apéndice A). Nótese que la disminución de la concentración de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ conlleva a tiempos de migración ligeramente mayores, y colas de picos ligeramente menos pronunciadas (ver lado izquierdo de la Figura 12), indicando un efecto de isoterma no lineal, como se ha reportado previamente en fases enlazadas para cromatografía líquida y electroforesis capilar.^{62, 63} La lisozima (lado derecho de la Figura 12) exhibe

picos asimétricos con colas y tendencia de migración opuesta al comportamiento del complejo de rutenio (es decir, cuando la concentración de la proteína aumenta la asimetría y el tiempo de migración aumentan), lo cual sugiere no solamente que el equilibrio adsorción-desorción es lento, sino también que ese factor cinético supera el efecto de sobresaturación de la muestra (isoterma no lineal). Este comportamiento es característico de proteínas compactas de alto pI como la lisozima.^{64, 65} Nótese que la extensión de este efecto es marcado aún para el capilar propanolado, el cual a pesar del buen recubrimiento deja desprotegidos los silanoles debajo de los grupos propanol anclados. Es posible que este efecto sea debido al tamaño menor y alta flexibilidad del grupo propanol y a que la proteína puede acercarse (tal vez “aplastarlos”) permitiendo mayor interacción con silanoles que son activos con respecto a la adsorción. Una información interesante que se extrae de la Figura 12 y del apéndice A es que los grupos hidroxilos regenerados por la hidrólisis de SiH parecen ser menos activos que los silanoles de un capilar no modificado, lo cual se evidencia en el hecho que las áreas corregidas –que son una medida indirecta de la ausencia de adsorción (o recuperación del soluto)– son consistentemente menores para este último.

Con base en los anteriores resultados, se considera que la modificación de capilares con grupos propanol es útil para separación de moléculas menos complejas que proteínas. Teniéndose en cuenta que en este trabajo la modificación con grupos propanol es una etapa intermedia para anclar un iniciador útil para ATRP (grupo BMP), como ventaja adicional puede considerarse que la fase resultante está compuesta por grupos iniciadores activos dispersos sobre una densa matriz de grupos propanoles inactivos. Es relevante agregar que se intentó desarrollar la síntesis del iniciador BMP directamente sobre la superficie (síntesis en una sola etapa) pero no se obtuvieron coberturas del iniciador lo suficientemente altas como para evitar la adsorción de proteínas en capilares que fueron polimerizados sobre el iniciador. Por razones de espacio esta información no se muestra en el presente documento.

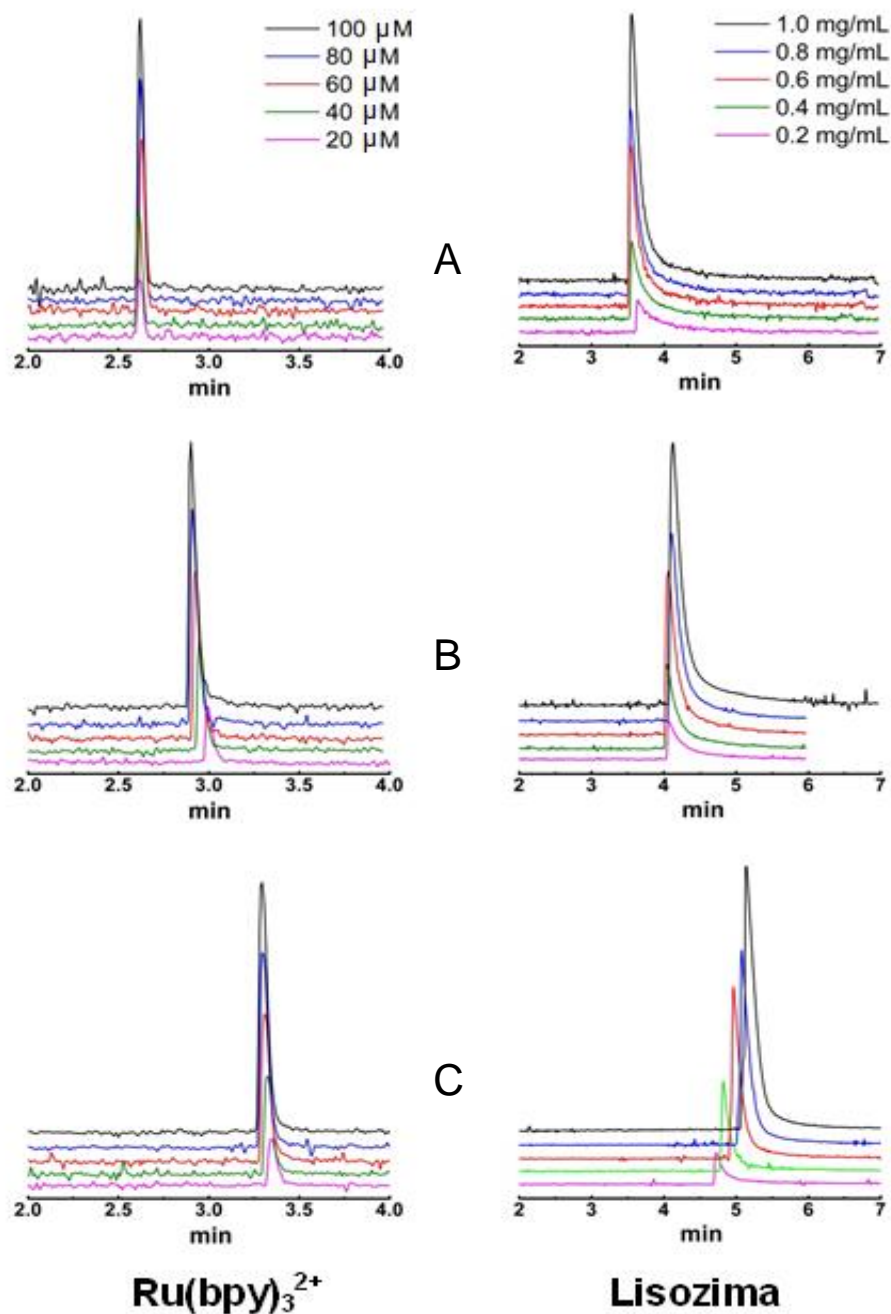
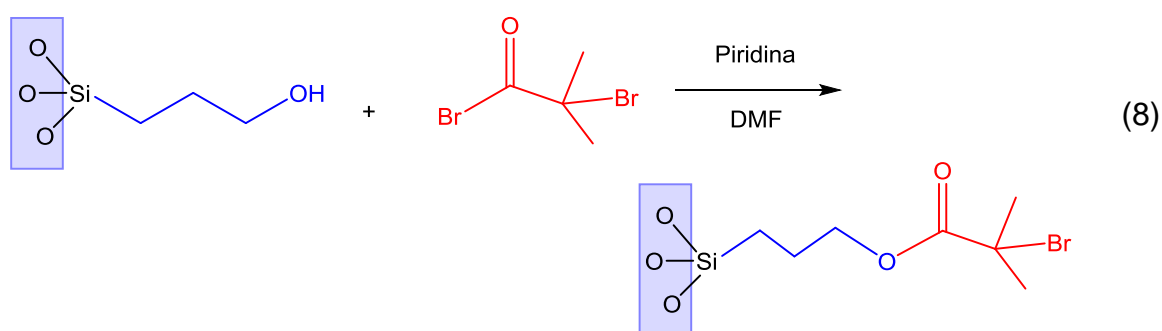


Figura 12. Efecto de la concentración de solutos sobre la migración y forma del pico del complejo Ru(bpy)_3^{2+} (lado izquierdo) y lisozima (lado derecho) en capilar (A) no modificado, (B) hidratado e hidrolizado y (C) propanolado. Todos de un mismo lote y dimensiones iguales que en la Figura 11. Condiciones CE: inyección hidrodinámica (3 s a 50 mbar) de solución 20-100 μM de Ru(bpy)_3^{2+} y 0.2-1.0 mg/mL de lisozima en electrolito, potencial de 14.0 kV (9.7 μA), detección a 286 nm (Ru(bpy)_3^{2+}) y 210 nm (lisozima).

5.2. ESTERIFICACIÓN – INMOVILIZACION DEL INICIADOR BMP

El iniciador BMP de polimerización se inmoviliza sobre la superficie a partir de la esterificación de los grupos propanol (*vide infra*, reacción 8). Si bien esta reacción ya es bien conocida en fase homogénea, su realización en la superficie del capilar no es simple debido, no solamente a las estrictas condiciones anhidras que se requieren, sino también por la alta probabilidad que se obstruya el tubo capilar con el subproducto de la reacción. En un trabajo anterior se estudiaron diferentes solventes y aminas para mantener solubilizada la sal que se forma entre el HBr y la amina.⁶⁶ El solvente DMF y la piridina se seleccionaron para esta reacción, que se lleva a cabo durante 6 horas y temperatura ambiente como se describe en la sección 4.4.6.



Se confirma el anclaje del iniciador ATRP mediante IR y NMR. La Figura 13 muestra el espectro de DRIFT de la sílica modificada con propanol y luego esterificada mediante el proceso descrito en la reacción 8. Se puede observar en el recuadro la presencia de la banda de absorción típica del grupo carbonilo a 1750 cm^{-1} presente en el grupo BMP. Adicionalmente, se pueden observar ligeras diferencias en la región $2900\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ producto de los estiramientos de grupos C-H del iniciador BMP. El espectro de NMR ^{13}C CP-MAS (Figura 14) también confirma el anclaje exitoso del iniciador de polimerización BMP. Se destaca que la señal correspondiente al grupo carbonilo no es intensa, lo que también se puede ver en el espectro DRIFT.

La Tabla 3 muestra el recubrimiento obtenido para la sílica propanolada y luego modificada con grupos BMP. El recubrimiento obtenido para la sílica modificada con propanol no es exactamente el mismo descrito en la Tabla 1, ya que los datos obtenidos corresponden a la modificación de un lote diferente de sílica Nucleosil™ (7 μ m de diámetro, 81 m²/g). En la Tabla 3 se puede apreciar que el recubrimiento alcanzado para la modificación con el iniciador BMP es más bien bajo, pues solamente alrededor de un 32 % de todos los grupos propanol fueron esterificados. Este resultado es consistente con las débiles señales observadas en los espectros de NMR ¹³C CP-MAS y DRIFT para estos materiales. Como se verá en la sección que sigue, este recubrimiento de grupos iniciadores es suficiente para inmovilizar una película del polímero adecuada para la separación.

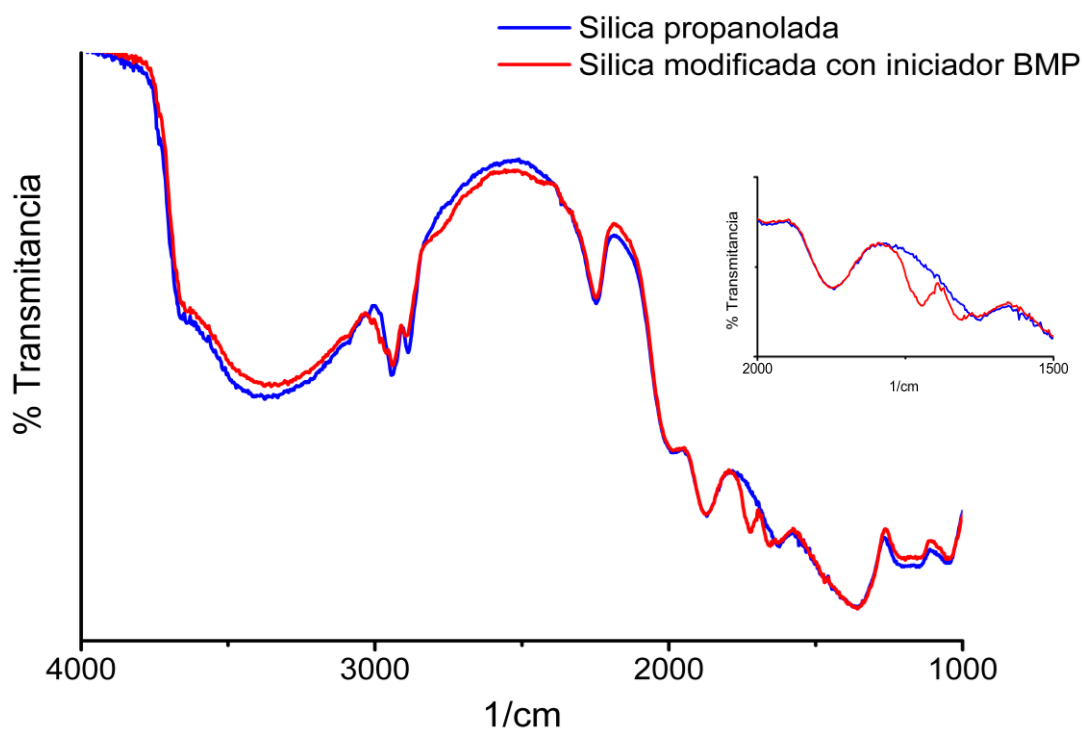


Figura 13. DRIFT de sílica (Nucleosil™) modificada con propanol y luego esterificada (modificada con grupos BMP).

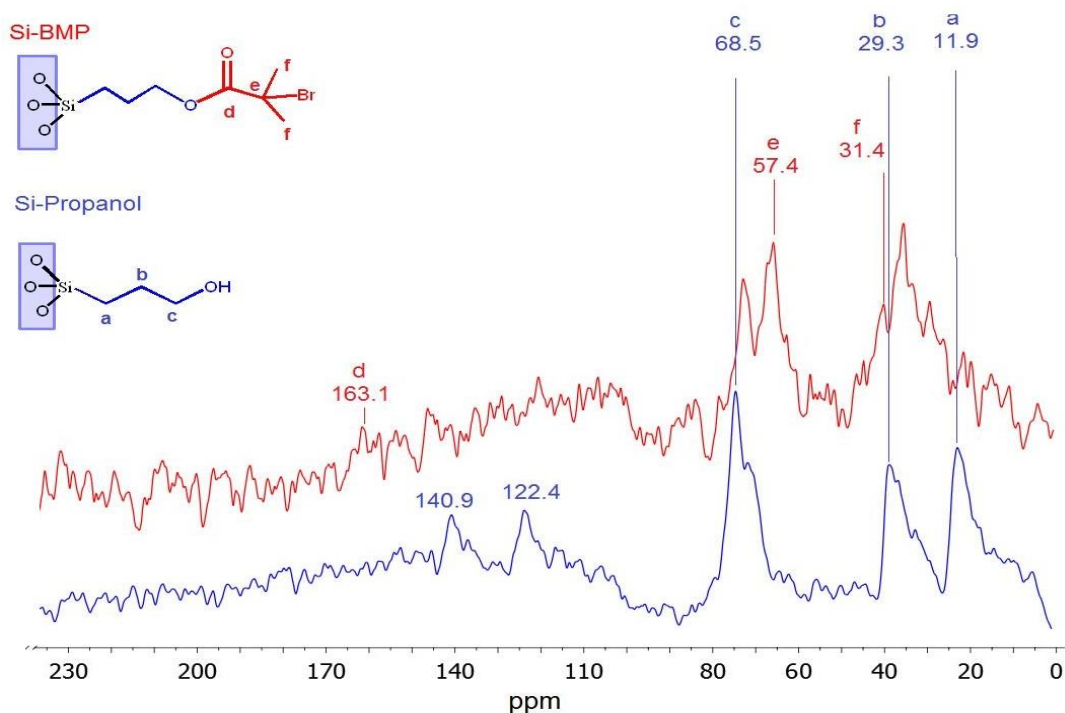


Figura 14. NMR ^{13}C CP-MAS de sílica (VydacTM) modificada con propanol y luego esterificada (modificada con grupos BMP). Desafortunadamente, la sílica Vydac parece ser más difícil de modificar que Nucleosil o YMC; de allí las señales tan débiles en estos espectros.

El estudio de la reacción de hidrosililación al igual que la esterificación, se desarrolló en conjunto con el Dr. Jorge. E Gómez como parte de su tesis doctoral.⁶⁶ Algunos de los resultados han sido publicados recientemente en la revista alemana *Electrophoresis*.⁵⁶

Tabla 3. Cobertura (Γ) de sílica (NucleosilTM) modificada con propanol y esterificada (modificada con grupos BMP)

Sustrato modificado con	% Carbono	Cobertura (Γ)	
		($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	(grupos/ nm^2)
Propanol	1.31	3.5	2.1
Iniciador BMP	1.72	1.1	0.7

5.3. EVALUACIÓN ESPECTROSCÓPICA Y MICROGRÁFICA DE RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS

La polimerización ATRP de los monómeros HEMA, HEA y AAE se confirma mediante técnicas espectrales (DRIFT y NMR ^{13}C CP-MAS) en sílica particulada, usada como sustrato análogo para la reacción sobre capilares. Las condiciones experimentales de polimerización fueron aquellas encontradas para capilares (*vide infra*). La Figura 29 muestra espectros DRIFT del iniciador BMP inmovilizado sobre sílica particulada, así como los productos de polimerización ATRP con AAE, HEMA y HEA.

Como se puede observar, la banda del grupo carbonilo a 1750 cm^{-1} es mucho más

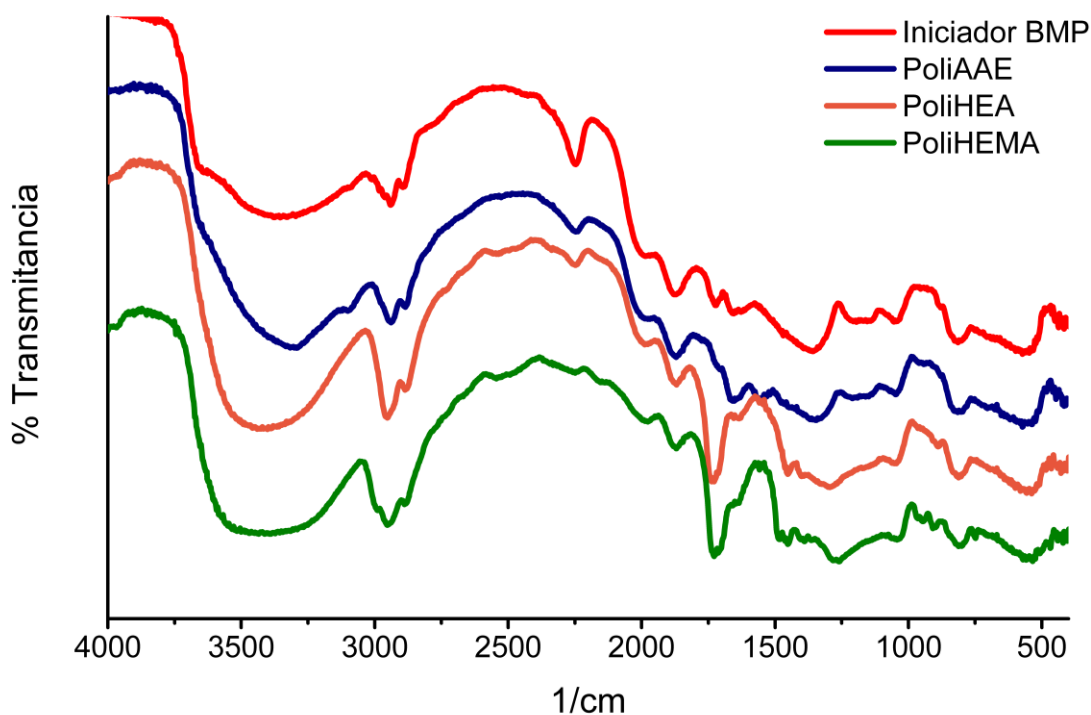


Figura 15. Espectro típico DRIFT de sílica (NucleosilTM) modificada con iniciador BMP y luego con poliAAE, poliHEA y poliHEMA.

intensa para HEMA y HEA que para AAE, lo que sugiere un mayor grado de polimerización para los ésteres derivados del ácido acrílico que para la amida AAE. La misma observación aplica a la banda de estiramiento C-H a 2850 cm^{-1} . Estas observaciones sobre los espectros DRIFT son consistentes con los espectros NMR correspondiente que se muestran en el apéndice B, donde la relación señal/ruido para la sílica recubierta con poliAAE es baja comparada con aquella recubierta con poliHEMA.

La Figura 16 muestra el grado de polimerización (n), calculado a partir de la relación entre el recubrimiento del iniciador BMP y el recubrimiento aparente del polímero, donde este último es un estimado obtenido a partir del peso molecular del monómero.⁵⁸ El cálculo del grado de polimerización asume que todos los iniciadores anclados reaccionan con un monómero produciendo la cadena polimérica, lo cual no es necesariamente cierto porque, en general, el polímero crece sobre solo una fracción de los grupos iniciadores.⁶⁷ Por lo tanto, dicho cálculo produce un valor subestimado del grado de polimerización. Esto significa que por lo menos 14 monómeros de AAE se apilan sobre cada iniciador BMP anclado, lo que predice una delgada película polimérica de AAE comparada con poliHEMA. Para este último se anclan 5 veces más monómeros que con AAE. Estos resultados son consistentes con las observaciones realizadas sobre los espectros DRIFT y NMR. Es oportuno mencionar que el peso molecular del polímero anclado (útil para una real estimación del grado de polimerización) no fue posible estimarlo de placas o capilares, porque se necesita una gran longitud y numerosas placas de sílica para extraer una cantidad de polímero cuantificable.

Adicionalmente, se utilizaron varias técnicas litográficas para examinar la topografía de la superficie de placas y capilares de sílica recubiertos con poliAAE. La Figura 17 muestra las micrografías SEM de un capilar recubierto con poliAAE. En la imagen B se puede observar el contorno irregular de la superficie interna del

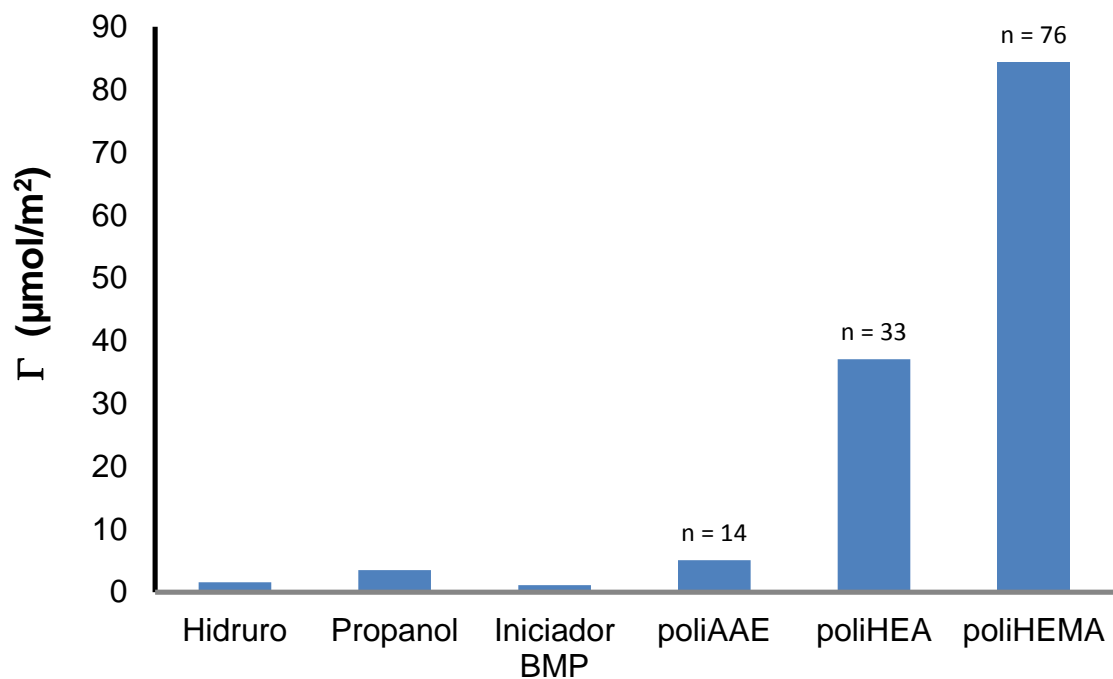


Figura 16. Cobertura (Γ) sílica (Nucleosil™) hidrurada, propanolada, iniciador BMP y polímeros de AAE, HEA y HEMA. n representa un estimado del grado de polimerización.

capilar, lo que sugiere la presencia de una película sobre la superficie. La rugosidad y algunos "grumos" que se observan en la imagen C indican que la capa polimérica de AAE es heterogénea, aunque parece evidente que no hay "islas" o parches de superficie sin recubrir. Esta última observación se confirma en la Figura 18 donde se muestran las imágenes AFM de una placa recubierta con poliAAE comparada con otra sin modificar. Es evidente la mayor rugosidad (3.16 nm) de la placa recubierta comparada con la nativa (0.31nm), lo que confirma una superficie polimérica irregular. Un acercamiento (*zoom*) al interior de las "hondonadas" de la imagen de arriba (defectos en la placa, posiblemente rayaduras) revela una topografía similar a la del resto de la placa, confirmando un recubrimiento libre de parches.

Desafortunadamente en la imagen B de la Figura 17 no hay contraste suficiente entre la sílica y el polímero para poder medir el espesor del recubrimiento

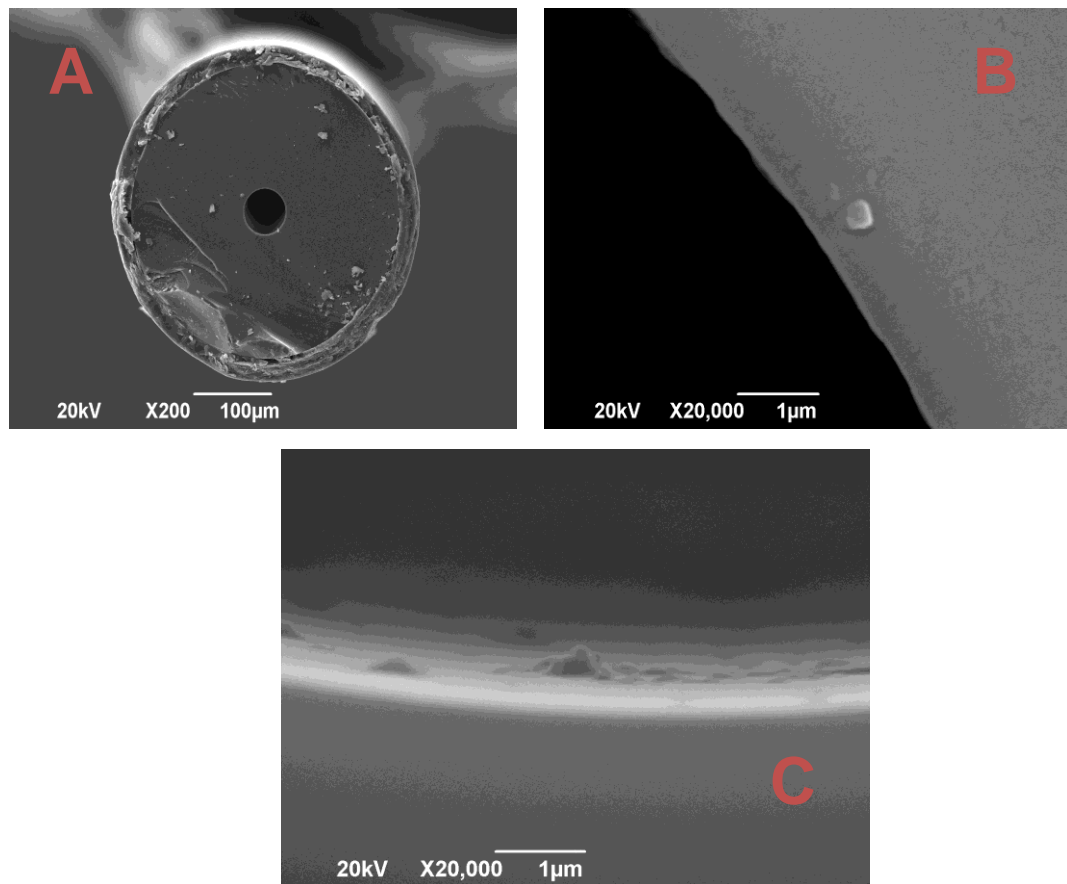


Figura 17. Imágenes SEM de capilar modificado con poliAAE. A) Corte transversal del capilar de 50 μm , B) y C) acercamiento al borde del capilar.

polimérico formado. Sin embargo, sí fue posible realizar la medición sobre la placa de sílica usando la técnica conocida como perfilometría. Esta tiene sus inicios en 1960 y fue creada para la caracterización topográfica de superficies. Un perfilómetro puede medir espesores de película hasta decimas de nanómetro, a partir del seguimiento que hace un láser a la punta de diamante que traza un barrido sobre la superficie.^{68, 69} La Figura 19 muestra la fotografía de la punta de diamante sobre la placa, la cual fue previamente fracturada para poder realizar un barrido desde la zona sin modificar hasta aquella que está recubierta con el polímero. El espesor de la película de AAE obtenido para tres mediciones es de

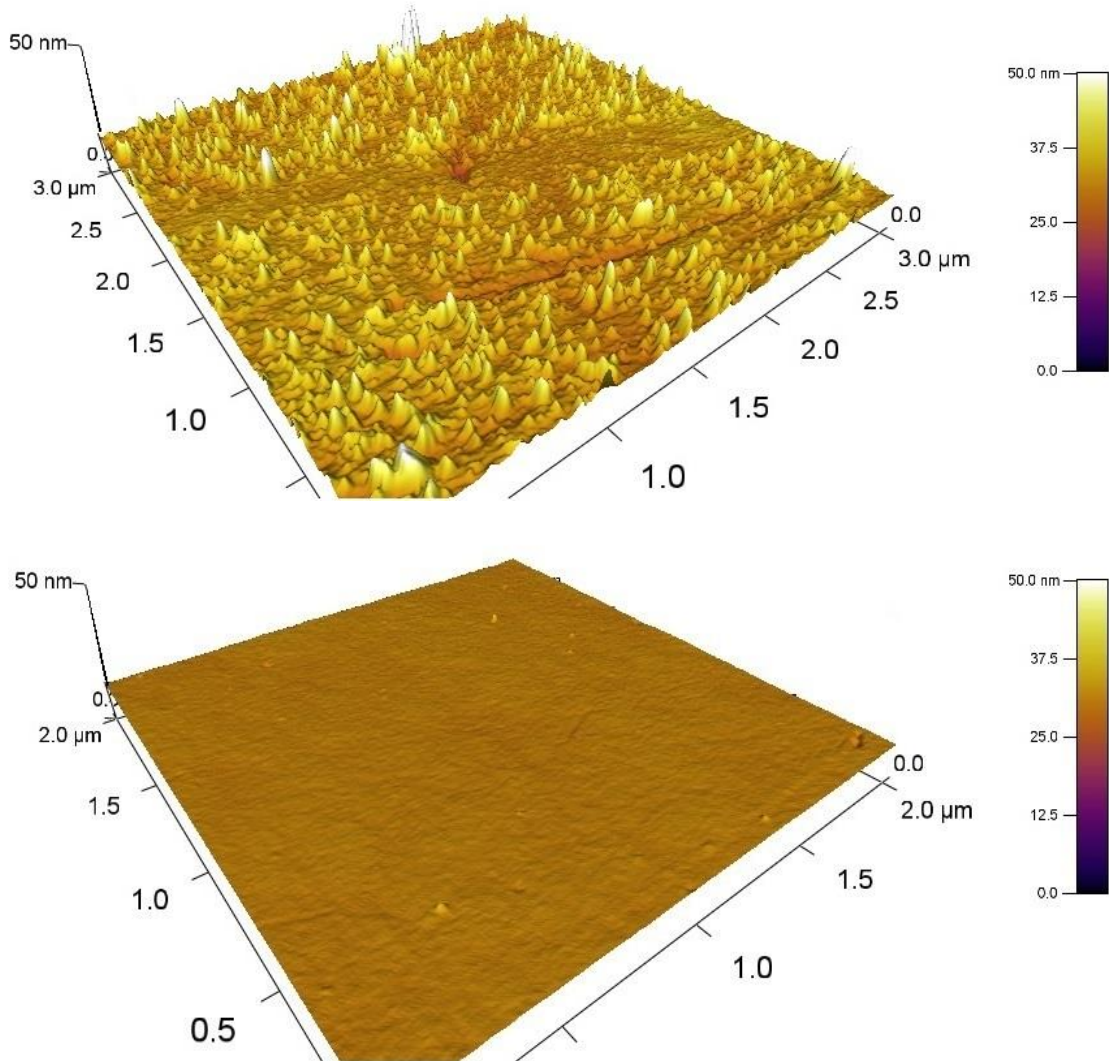


Figura 18. Imágenes AFM de placas de sílica modificada con poliAAE (arriba) y no modificada (abajo). Áreas de muestreo de $2\mu\text{m}\times 2\mu\text{m}$.

59 ± 8 nm, lo que evidencia un polímero de longitud corta. Este resultado es consistente con el espesor obtenido por elipsometría (53 nm), una técnica óptica no invasiva y no destructiva que usa como principio el cambio en la polarización que sufre la luz incidente sobre una superficie.⁷⁰

Los resultados de caracterización por microscopía (SEM, AFM, perfilometría y

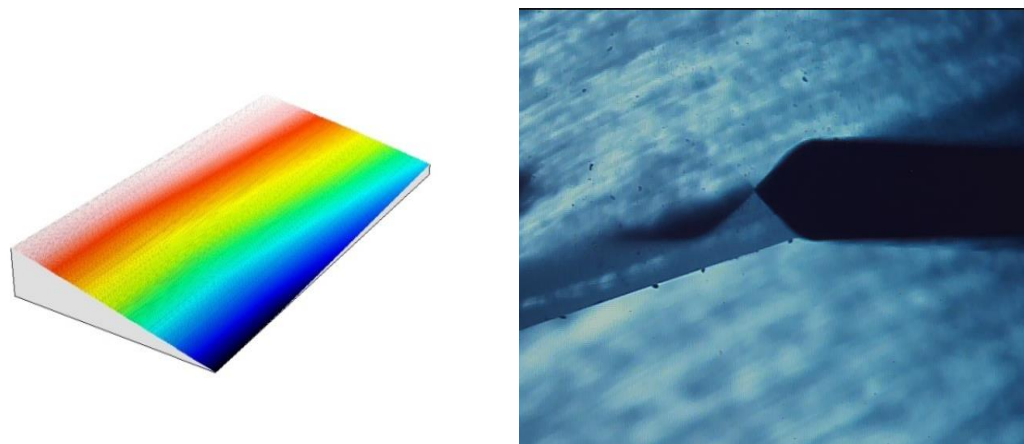


Figura 19. Perfil obtenido en 3D (izquierda) del trazo hecho por la punta de diamante sobre la placa modificada con poliAAE (derecha).

elipsometría), espectroscopía (DRFT y NMR) y valores de recubrimiento indican que la polimerización de AAE no es tan efectiva como la de los monómeros HEA y HEMA. Es posible que AAE sea más susceptible a la baja cobertura del iniciador de polimerización que los demás monómeros. Por otro lado, un espesor de película de 50 a 60 nm –como el obtenido aquí con poliAAE– es comparable con aquel de un recubrimiento similar reportado por Chao Zhao y Jie Zheng.⁷¹ Estos autores utilizaron el mismo monómero bajo condiciones ATRP similares, pero sobre un sustrato de oro, no de sílica. Más importante, el recubrimiento obtenido por estos investigadores exhibía un comportamiento *non-fouling* con respecto a varias proteínas.

5.4. CAPILARES MODIFICADOS CON POLÍMERO

La polimerización controlada ATRP es uno de los aspectos más importantes de esta investigación. Si bien en el pasado reciente ya se han reportado unos pocos estudios de ATRP para CE,^{21, 72} la metodología planteada en éste trabajo produce una fase consistente en largas cadenas hidrofílicas inmovilizadas sobre una densa capa de grupos propanol también hidrofílicos. Paralelamente, la fase deberá

exhibir una estabilidad hidrolítica mejorada como resultado de, no solamente un enlace Si-C muy estable entre el sustrato y cualquier grupo anclado, sino también de la N-sustitución de los monómeros AAE y AAP.

Para desarrollar recubrimientos *non-fouling* efectivos es necesario que las cadenas poliméricas estén muy hidratadas; esto se logra en nuestro caso con el carácter hidrofílico de las cadenas poliméricas. El agua fuertemente adsorbida sobre las cadenas (vía puentes de hidrógeno, principalmente) forma una barrera física y energética que impide la adsorción de proteínas sobre ellas. La fortaleza con la cual el agua es adsorbida está determinada por la naturaleza química de la película (carácter hidrofílico y conformación estructural de las cadenas), así como de la densidad de empaquetamiento de las cadenas (cadenas/nm²) y su longitud (espesor de la película).^{73, 74}

Si bien la reacción de esterificación no resultó con la densidad de iniciador esperada, este hecho podría beneficiar la dinámica del crecimiento del polímero.^{67, 75-77} Por ejemplo, Kim *et al.* encontraron que una baja concentración de radicales (baja densidad de iniciadores) sobre la superficie de una lámina de oro produce películas poliméricas de crecimiento rápido aunque también una terminación rápida.⁷⁷ Desde el punto de vista de adsorción de proteínas, la baja densidad del iniciador se puede compensar dejando crecer el polímero hasta que se obtenga un espesor adecuado, controlando las condiciones de polimerización. Para lograr este fin, en este trabajo se estudia el efecto de las concentraciones de monómero y entrecruzante, utilizando como criterio la forma de la banda electroforética del complejo de rutenio y de la lisozima para evaluar la extensión con la cual estas sondas moleculares interactúan con la superficie recubierta del capilar. Eficiencia, asimetría y área corregida para cada pico se miden bajo condiciones típicas de separación CE.

El esquema de las condiciones experimentales de polimerización ATRP que se emplea en la presente investigación se muestra en la Figura 20. Es importante mencionar que, inicialmente la polimerización de HEA se realizó bajo las mismas condiciones experimentales que su homólogo HEMA; específicamente, el catalizador $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{bpy})_2]^+$ y el solvente metanol:agua (1:1). Sin embargo, no se obtienen buenos resultados en términos de adsorción de proteínas sobre capilares, como sí sucede cuando la polimerización de HEA se realiza con $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{Me}_6\text{TREN})]^+$ y etanol:agua (4:1). Se sabe que el ligando Me_6TREN tiene una constante de estabilidad más de treinta mil veces mayor que la bipyridina en ATRP,³³ lo que sugiere que HEA es mucho menos activo que HEMA, al requerir un catalizador más potente para obtener un recubrimiento similar al de HEMA en términos de adsorción de proteína.

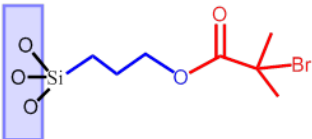
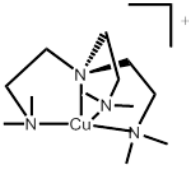
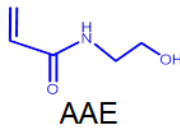
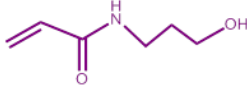
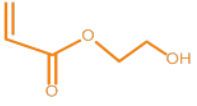
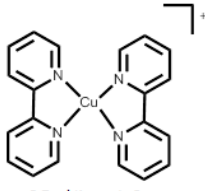
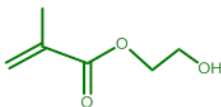
Iniciador BMP inmovilizado	Catalizador	Solvente	Monómero
	 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{Me}_6\text{TREN})]^+$	etanol:agua (4:1)	 AAE  AAP  HEA
	 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{bpy})_2]^+$	metanol:agua (1:1)	 HEMA

Figura 20. Esquema de condiciones experimentales ATRP.

5.4.1. Concentración de monómeros y entrecruzantes

En la Figura 21 se puede observar que, para todos los monómeros, la EOM no sufre cambios significativos con la concentración, manteniéndose a un nivel muy bajo.

Los perfiles CE de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y lisozima a diferentes concentraciones de AAE (Figura 22) indican que a bajas concentraciones de monómero (0.5 M a 2 M) se obtienen las mayores eficiencias y menores asimetrías. Aunque el efecto de la concentración sobre el área del pico es menos claro, la menor EOM obtenida es para estos niveles de concentración. Así, 1M es la concentración de monómero escogida para futuras películas de poliAAE

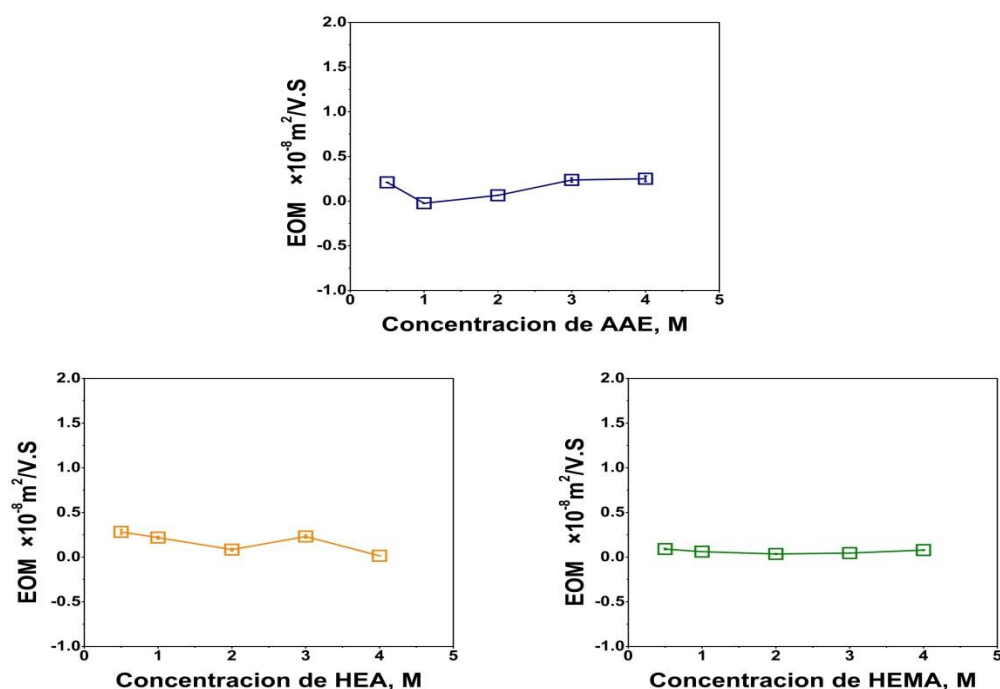


Figura 21. Efecto de la concentración del monómero sobre la movilidad electroosmótica. Condiciones: capilares de 35.0 cm (longitud efectiva, 26.5 cm) y 50 μm id. Cada capilar se acondicionó dinámicamente con el electrolito a 7 bar por 15 min. Potencial, 14 kV (40 kV/m, 8.1 μA); t_v , 15 min; *buffer*, PIPPS 25 mM pH 4.0; marcador neutro, DMSO 5 mM; inyección, 3 s a 50 mbar; detección, 200 nm. Las barras de error representan ± 1 desviación estándar ($n = 3$).

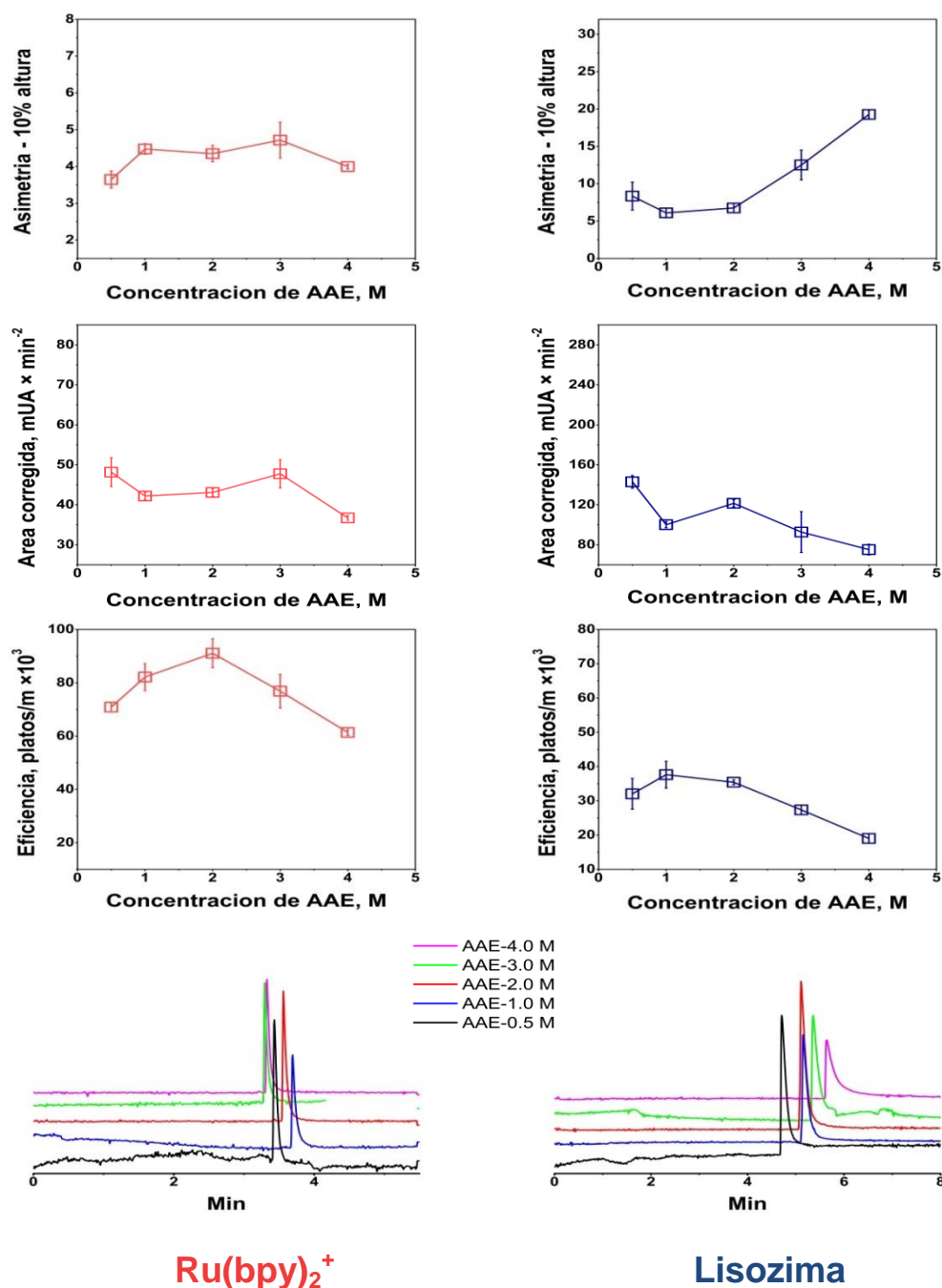


Figura 22. Efecto de la concentración del monómero AAE sobre el perfil electroforético del complejo Ru(bpy)₃²⁺ (izquierda) y lisozima (derecha). Condiciones: inyección hidrodinámica (3 s a 50 mbar) de 250 μM de Ru(bpy)₃²⁺ y 0.50 mg/mL de lisozima en electrolito, potencial aplicado de 14.0 kV (9.8 μA), detección a 286 nm (Ru(bpy)₃²⁺) y 210 nm (lisozima). El *buffer* empleado fue PIPPS 25 mM, pH 4.0. Todos los capilares tenían una longitud total de 35.0 cm, 26.5 cm de longitud efectiva y 50 μm id.

Para los capilares recubiertos con poliHEA, la Figura 23 muestra que la asimetría, el área corregida y la eficiencia $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ no varían significativamente en todo el rango de concentración del monómero considerado. Por otro lado, para la lisozima la tendencia general es que la simetría, la eficiencia y el área corregida mejoran a medida que aumenta la concentración del monómero. Se seleccionó la concentración 2 M para modificaciones posteriores debido a que altas concentraciones del monómero hacen que la solución reaccionante final sea muy viscosa, lo cual dificulta el paso de esta a través del capilar. Además la eficiencia y asimetría tienden a alcanzar un *plateau* alrededor de 2 M. Para el caso del monómero HEMA, la Figura 24 muestra una tendencia general tanto de las áreas corregidas como la eficiencia de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y lisozima a mejorar (aumentar) a medida que se aumenta la concentración del monómero. Similar a la EOM, el comportamiento general de la asimetría para las dos sondas es muy estable y baja en todo el rango de concentración considerado. Estas observaciones sugieren que la polimerización de HEMA es bastante “robusta” con respecto a cambios de la concentración molar del monómero. Debido al incremento en las áreas corregidas de ambas sondas a altas concentraciones, se seleccionó la concentración 4 M para estudios posteriores de polimerización de HEMA. En contraste con el monómero HEA, HEMA no exhibe altas viscosidades a esta concentración.

Con el fin de minimizar aún más las interacciones entre la pared cubierta del capilar y las proteínas (ver Figura 4), se incorporan pequeñas cantidades de agente entrecruzante en la solución polimerizante. La Figura 25 ilustra la similitud estructural entre cada monómero y el correspondiente entrecruzante. Aunque el entrecruzamiento, como se mencionó anteriormente, busca mejorar el carácter *non-fouling* de la película polimérica, es importante que su concentración no disminuya la flexibilidad de la cadena polimérica, ni impida el acceso de moléculas de agua que se puedan asociar con la misma, disminuyendo en ambos los casos la hidratación (y por lo tanto, el carácter *non-fouling*) del recubrimiento.

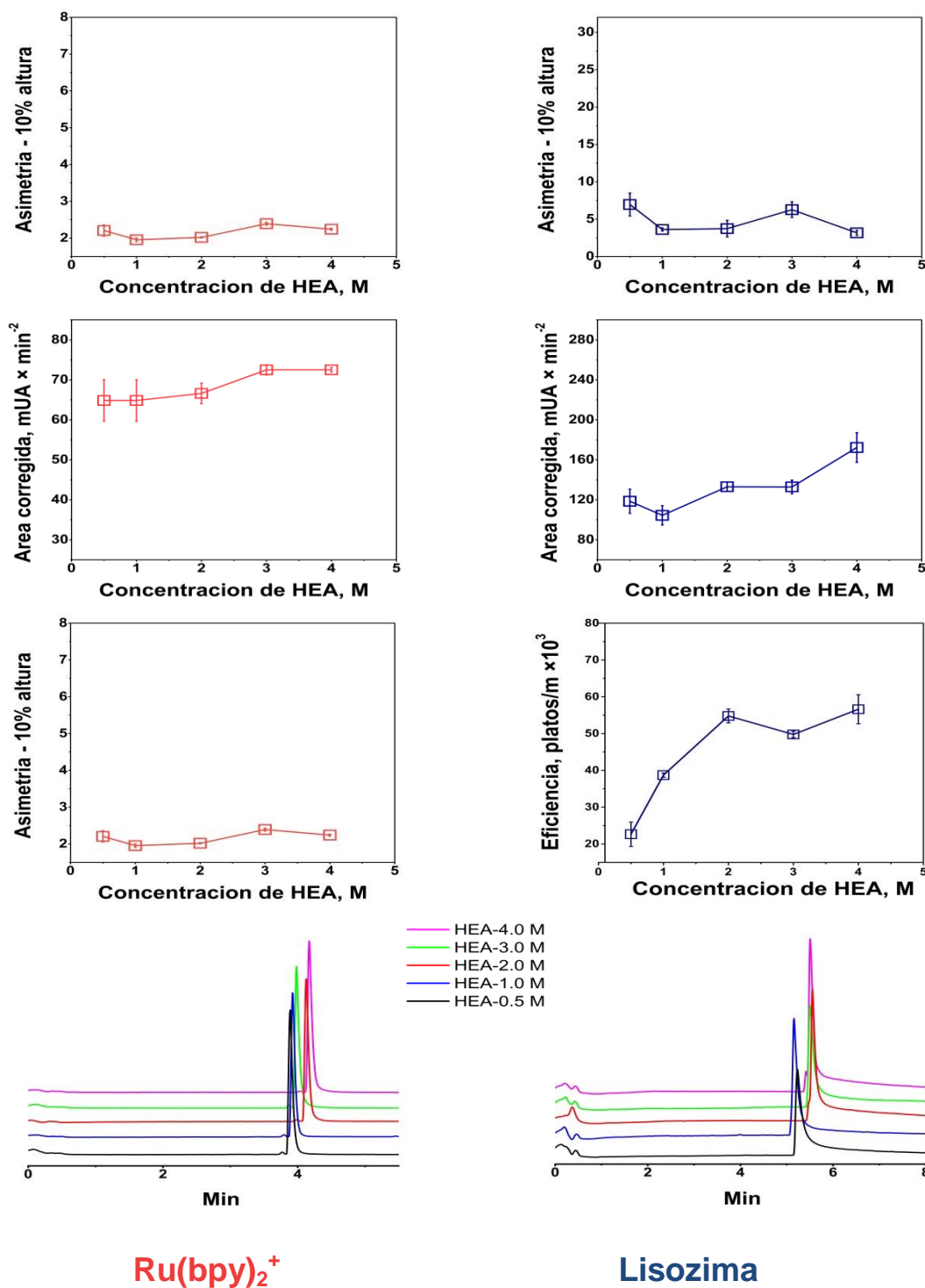


Figura 23. Efecto de la concentración del monómero HEA sobre el perfil electroforético del complejo Ru(bpy)₃²⁺ (izquierda) y lisozima (derecha). Las condiciones CE fueron las mismas empleadas en la Figura 21.

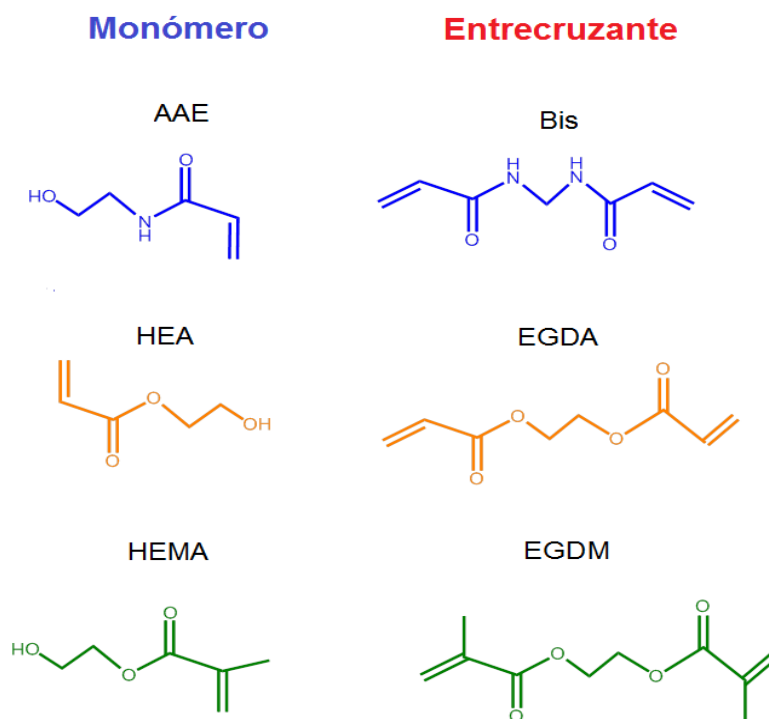


Figura 25. Estructura de monómeros y correspondientes entrecruzantes empleados en este trabajo.

En la Figura 26 se observa que la concentración de ningún entrecruzamiento tiene un efecto notable sobre la movilidad electroósmótica, comportamiento similar a aquel de la concentración del monómero. Además, es de notar que el flujo del electrolito en estos capilares se mantiene muy bajo.

La Figura 27 muestra el efecto de incorporar 0.25 a 1 % molar de Bis en la solución polimerizante de AAE 1 M. Es evidente en esta figura que el entrecruzante ejerce un efecto positivo sobre la película polimérica en términos de menor adsorción respecto al recubrimiento que no lo es. En general, los resultados con ambas sondas muestran menor asimetría y mayor área corregida a concentraciones del entrecruzante Bis de 0.25% molar y superiores. Esa concentración se usa en los experimentos posteriores con AAE.

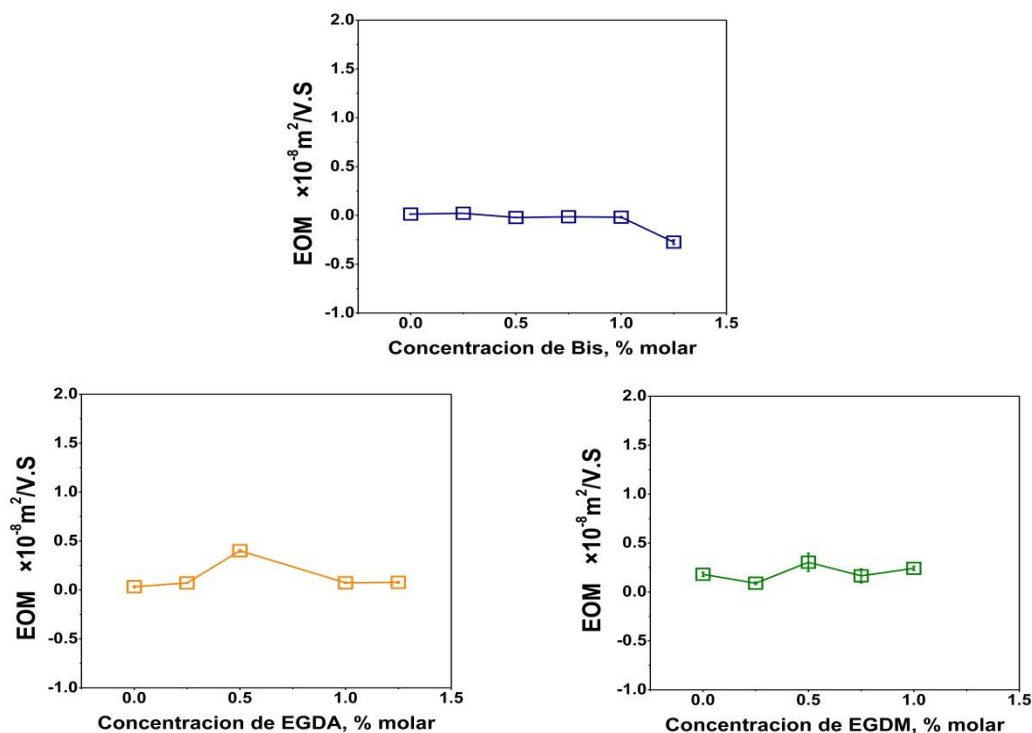


Figura 26. Efecto de la concentración del entrecruzante sobre la movilidad electroósmótica. Las condiciones CE fueron las mismas empleadas en la Figura 21.

Dada la similitud estructural, los resultados del estudio de concentración de monómero AAE y Bis fueron extrapolados para el monómero AAP. Debido al elevado costo de AAP (alrededor de 700 mil pesos por 1 mL de reactivo al 50%) no se consideró conveniente realizar dicho estudio. La diferencia estructural entre el monómero AAE y AAP es únicamente un grupo metileno, CH_2 . Así, la concentración de AAP empleada en la modificación de capilares fue 1.0 M y 0.25% molar de Bis.

El efecto de la incorporación del entrecruzante EGDA a la solución polimerizante 2 M de HEA se muestra en la Figura 28. Puede apreciarse que la tendencia de la película polimérica de HEA a interactuar con $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y lisozima no se ve afectada significativamente por la incorporación del entrecruzante. Ya que no

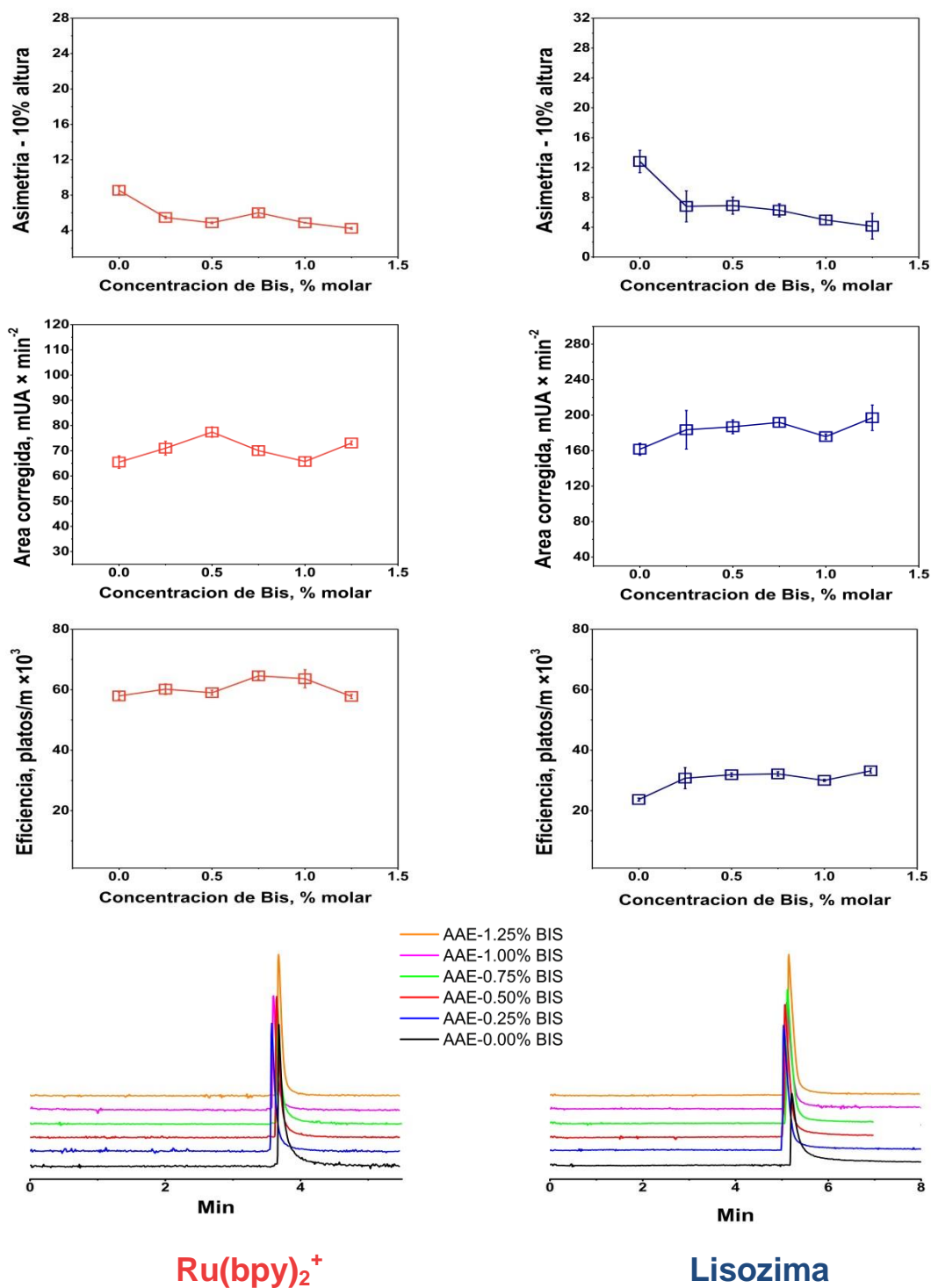


Figura 27. Efecto de la concentración del entrecruzante Bis sobre el perfil electroforético del complejo Ru(bpy)₃²⁺ (izquierda) y lisozima (derecha). Las condiciones CE fueron las mismas empleadas en la Figura 21.

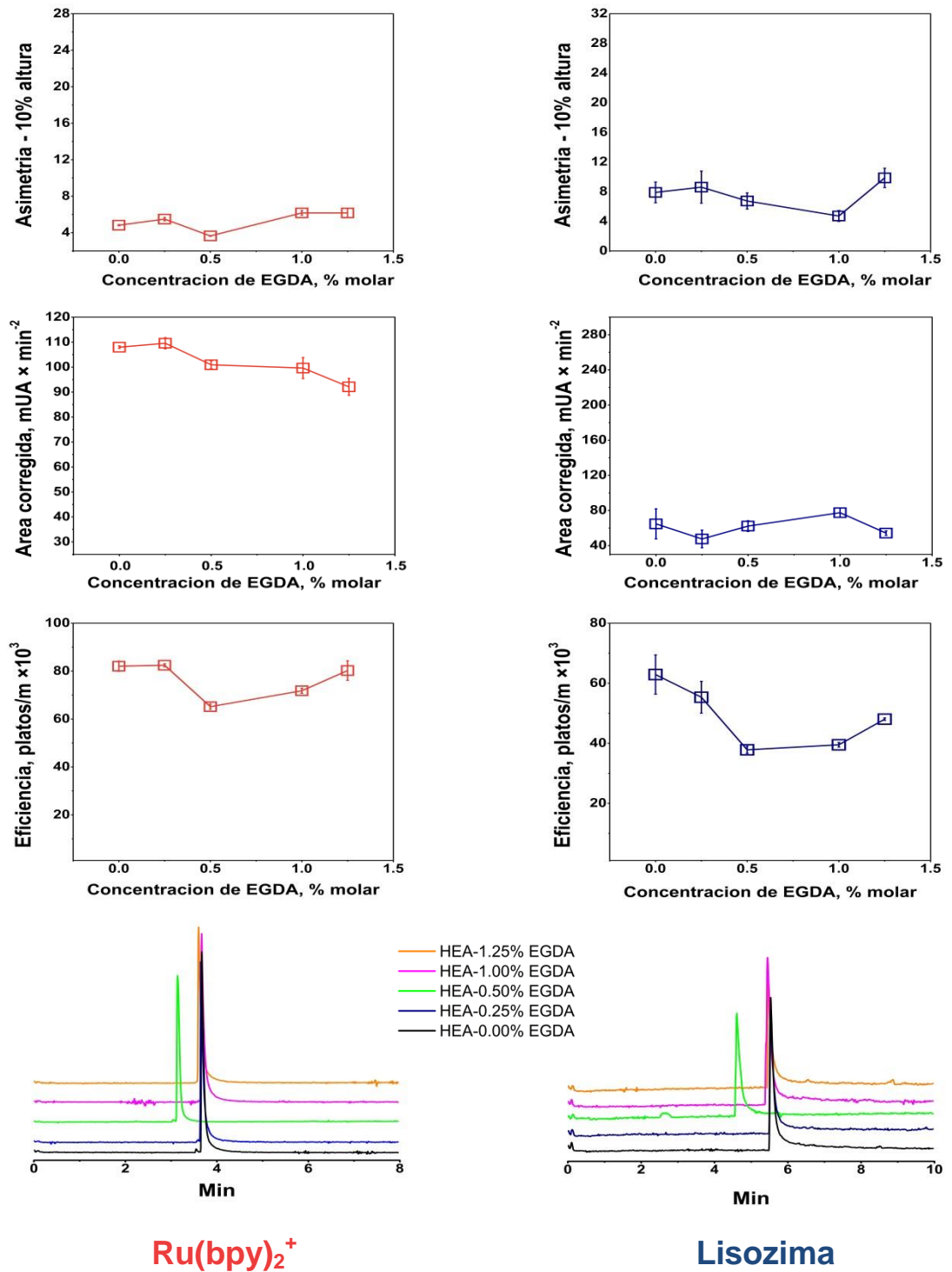


Figura 28. Efecto de la concentración del entrecruzante EGDA sobre el perfil electroforético del complejo Ru(bpy)₃²⁺ (izquierda) y lisozima (derecha). Las condiciones CE fueron las mismas empleadas en la Figura 21.

afecta negativamente la adsorptividad de la película polimérica, pero sí podría ser beneficiosa para su estabilidad electrolítica, en experimentos posteriores se incorpora una concentración 0.25 % molar de EGDA en HEA.

Similar a HEA, en la Figura 29 el entrecruzante EGDM para HEMA no afecta significativamente la tendencia de la película polimérica a adsorber las sondas moleculares $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y lisozima. Igual que con HEA, se incorpora una pequeña concentración de EGDM, 0.25% molar, en la solución polimerizante de HEMA.

Las Tablas 4 y 5 comparan el efecto de los entrecruzantes sobre el comportamiento de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y lisozima respectivamente. Se puede concluir que la polimerización de AAE requiere del entrecruzante Bis, puesto que mejora los perfiles de las sondas moleculares $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y lisozima en asimetría, área corregida y eficiencia. En el caso de HEA la presencia del entrecruzante EGDA no tiene un efecto significativo sobre la banda del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^2$. Sin embargo, el perfil de lisozima sí mejora como resultado de incorporar el entrecruzante, por lo anterior se considera favorable incorporar EGDA en la polimerización de HEA.

Desde el punto de vista de adsorción de las dos sondas moleculares estudiadas, la polimerización de HEMA, como se mencionó anteriormente, no se ve afectada significativamente por la incorporación de EGDM como entrecruzante.

5.4.2. Separación CE de proteínas y péptidos

CE puede separar mezclas de proteínas de acuerdo a su electromovilidad, sin embargo, debido la complejidad de estos solutos, múltiples interacciones de tipo puente de hidrógeno, intercambio iónico e hidrofóbico hacen que se adsorban fuertemente sobre la superficie de sílica.^{78, 79} Eventualmente, si la proteína se adsorbe completamente sobre la superficie, se modifica el flujo electroósmótico lo que conlleva a una menor precisión de los tiempos de migración. En este trabajo

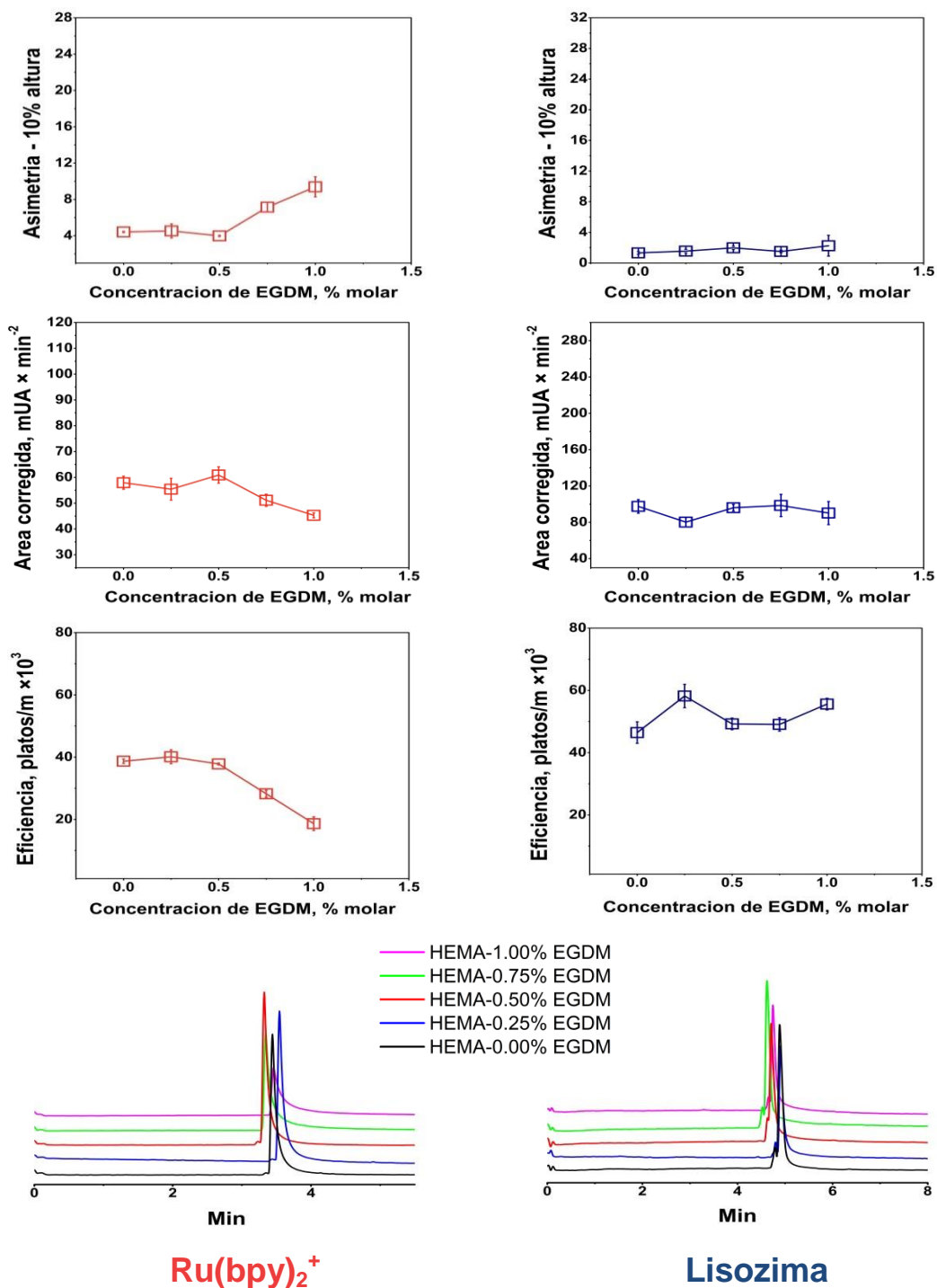


Figura 29. Efecto de la concentración del entrecruzante EGDM sobre el perfil electroforético del complejo Ru(bpy)₃²⁺ (izquierda) y lisozima (derecha). Las condiciones CE fueron las mismas empleadas en la Figura 21.

Tabla 4. Resumen del efecto de entrecruzantes sobre el perfil electroforético del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$

Modificación	Asimetría 10 % altura	Área corregida $\text{mUA} \times \text{min}^{-2}$	Eficiencia $\text{platos/m} \times 10^3$
AAE (1M)	8.5±0.5	66±2	58±1
AAE(1M) - 0.25% Bis	5.5±0.1	71±3	60±2
AAP (1M)	4.0±0.2	69±2	481
AAP(1M) - 0.25% Bis	4.0±0.1	77±1	99.1±0.4
HEA 2M	4.8±0.1	108.1±0.5	82±2
HEA(2M) - 0.25% EGDA	5.5±0.2	109±2	82.4±0.6
HEMA (4M)	4.4±0.1	58±2	38.7±0.7
HEMA(4M) - 0.25% EGDM	4.5±0.8	55±4	40±2

Tabla 5. Resumen del efecto de entrecruzantes sobre el perfil electroforético de lisozima

	Asimetría 10 % altura	Área corregida $\text{mUA} \times \text{min}^{-2}$	Eficiencia $\text{platos/m} \times 10^3$
AAE (1M)	12±2	161±7	23.7±0.5
AAE(1M) - 0.25% Bis	6.8±2.1	183±22	30.7±0.3
AAP (1M)	11.1±0.7	59±4	36±1
AAP(1M) - 0.25% Bis	2.9±0.2	166±10	38.6±0.2
HEA 2M	7.9±1.4	65±17	63±6
HEA(2M) - 0.25% EGDA	8.6±2.2	48±10	55±5
HEMA (4M)	1.3±0.2	98±7	44±3
HEMA(4M) - 0.25% EGDM	1.5±0.2	80±5	58±3

se ha realizado un gran esfuerzo por obtener recubrimientos poliméricos *non-fouling* que permitan separaciones con eficiencias cercanas al millón de platos teóricos para proteínas.⁸⁰ Algunas propiedades de las biomoléculas utilizadas se describen en la Tabla 6. Nótese que, mientras todas las proteínas tienen alto pI, solo bradiquinina dentro de los péptidos es lo suficientemente básica como para exhibir un muy alto pI.

Las separaciones de proteínas y péptidos se realizaron bajo idénticas condiciones experimentales (potencial, inyección, *buffer* de corrida, etc.) en todos los capilares. El *buffer* empleado para las separaciones es una mezcla de ácido láctico y el aminoácido GABA (por sus siglas en Inglés, *γ-aminobutyric acid*) con pH final 3.7, ampliamente utilizada en electroforesis convencional de gel.⁸¹ Este *buffer* permitió una mejor separación de proteínas comparado con PIPPS. Es importante destacar que la naturaleza, concentración y pH del *buffer* son variables cuya importancia solo es superada por la calidad del recubrimiento polimérico de las paredes internas de los capilares.

Tabla 6. Biomoléculas empleadas para la evaluación CE de capilares recubiertos con películas poliméricas hidrofílicas.¹

Biomoléculas	Origen	pI ²	P.M (Da)
Lisozima	Clara de huevo de pollo	11.35	14307
Citocromo C	Corazón de equino	10.0 - 10.5	12384
Citocromo C	Corazón de bovino	10.0 - 10.5	12327
Ribonucleasa A	Páncreas de bovino	9.6	13700
Tripsina	Páncreas de bovino	10.1 - 10.5	24000
Tripsinógeno	Páncreas de bovino	9.3	237000
α-Quimotripsinógeno	Páncreas de bovino	8.97	25600
Angiotensina H1	Sangre de humano	7.62	1296
Angiotensina H2	Sangre de humano	8.0	1046
Bradiquinina	Sangre de humano	11.5	1060
Oxitocina	Sangre de humano	6.96	1007

¹Datos obtenidos de <http://www.sigmaaldrich.com>

²Los datos de pI de los péptidos fueron calculados de acuerdo con <http://www.isoelectric.ovh.org>

Las Figuras 30 a 32 comparan los cuatro recubrimientos con agente entrecruzante con respecto a la separación de tres mezclas de proteínas. Comparado con los demás monómeros entrecruzados, el recubrimiento de AAP-Bis exhibe los picos más altos y delgados para todas las mezclas. Nótese, sin embargo, que todos los recubrimientos entrecruzados exhiben muy buenos perfiles de separación para la mezcla de péptidos (ver Figura 33), incluyendo bradiquinina (pl 11.5). Específicamente, HEMA-EGDM y AAP-Bis exhiben las mejores simetrías (2.9 y 4.0 respectivamente) para este soluto.

La Tabla 7 muestra las eficiencias del primer pico en la separación de proteínas básicas (Figuras 30 a 32) y el tercer pico (bradiquinina) en la separación de péptidos (Figura 33). Es claro que en este último caso se seleccionó bradiquinina por tener el más alto pl (más básico). Puede notarse que las mejores eficiencias se obtienen para los capilares modificados con AAP entrecruzado con Bis. Debe además destacarse que AAP-Bis fue el único con que se logró la separación de dos mezclas de proteínas adicionales que se muestran en la Figura C1 del Apéndice C. Bajo las condiciones de CE empleadas en esta comparación de recubrimientos, puede notarse que los capilares recubiertos con AAE-Bis no exhibieron una satisfactoria separación en la mayoría de las mezclas de proteínas

Tabla 7. Eficiencias de proteínas y péptidos separados a pH 3.7 en capilares con recubrimientos hidrofílicos entrecruzados (n = 3).

Recubrimiento polimérico	Eficiencia ¹ (platos/m) × 10 ⁴			
	Figura 30	Figura 31	Figura 32	Figura 33
AAE-Bis	---	32±2	---	6.0±0.1
AAP-Bis	26.68±0.03	23.9±0.6	27.0±0.3	5.38±0.02
HEA-EGDA	0.24±0.04	32±4	1.32±0.06	4.40±0.08
HEMA-EGDM	21.3±0.8	23.3±0.8	17±2	5.8±0.2

¹Las eficiencias fueron calculadas para lisozima (Figuras 30 y 32), citocromo C, bovino (Figura 31) y bradiquinina (Figura 33).

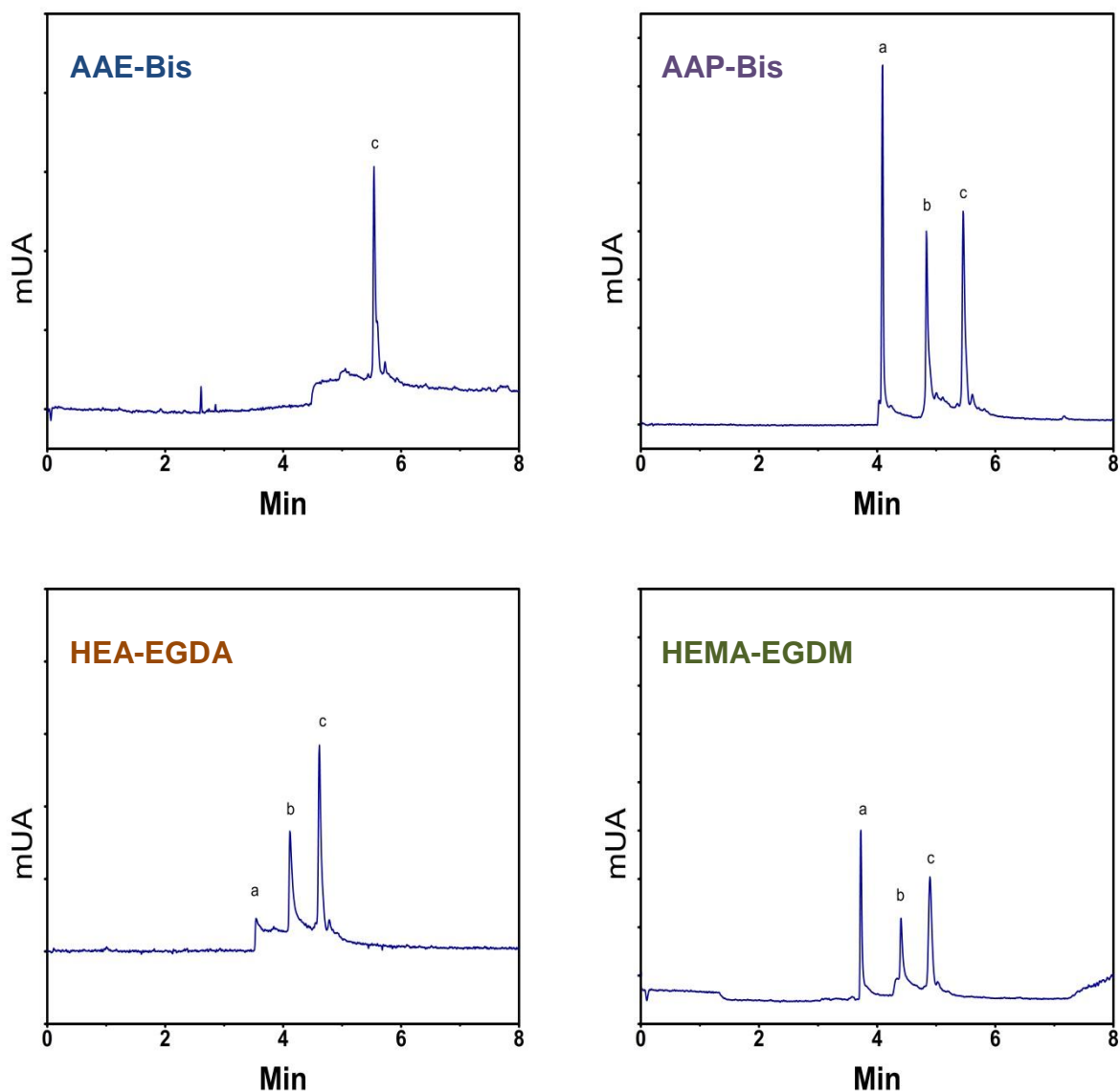


Figura 30. Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos entrecruzados. Condiciones: capilar de 35.0 cm (longitud efectiva, 26.5 cm) y 50 μ m id; potencial, 14 kV (40 kV/m, 9.0 μ A); *buffer*, ácido láctico 25 mM / GABA 36 mM a pH 3.7; concentración de proteínas 0.2 mg/mL en agua; inyección, 9 s a 20 mbar; detección, 200 nm. Solutos: (a) lisozima, (b) ribonucleasa A y (c) α -quimotripsinógeno.

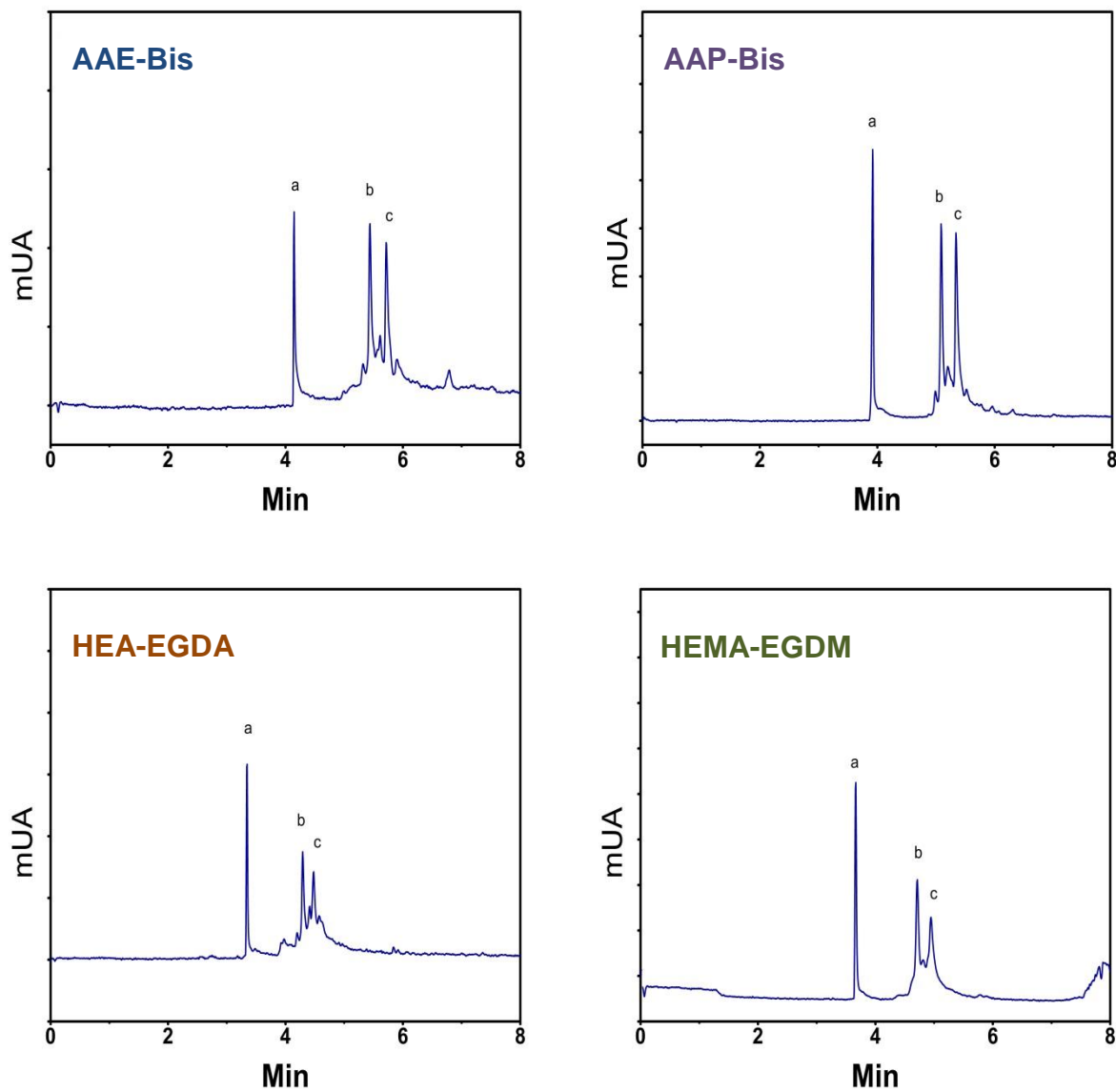


Figura 31. Separación de mezclas de proteínas en capilares polymerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31. Solutos: (a) citocromo C, bovino, (b) tripsinógeno y (c) α -quimotripsinógeno,

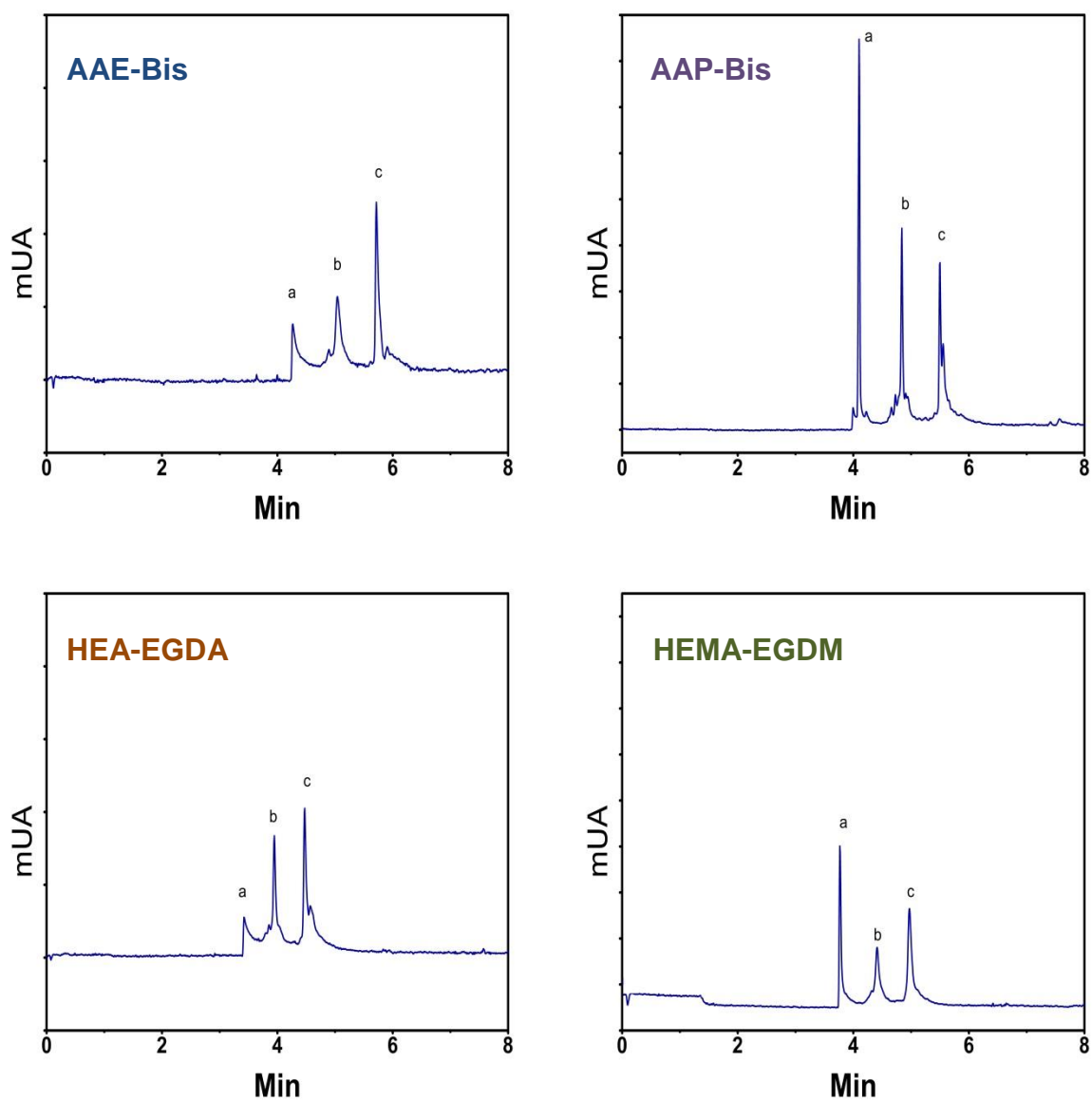


Figura 32. Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31. Solutos: (a) lisozima, (b) tripsina y (c) α -quimotripsinógeno

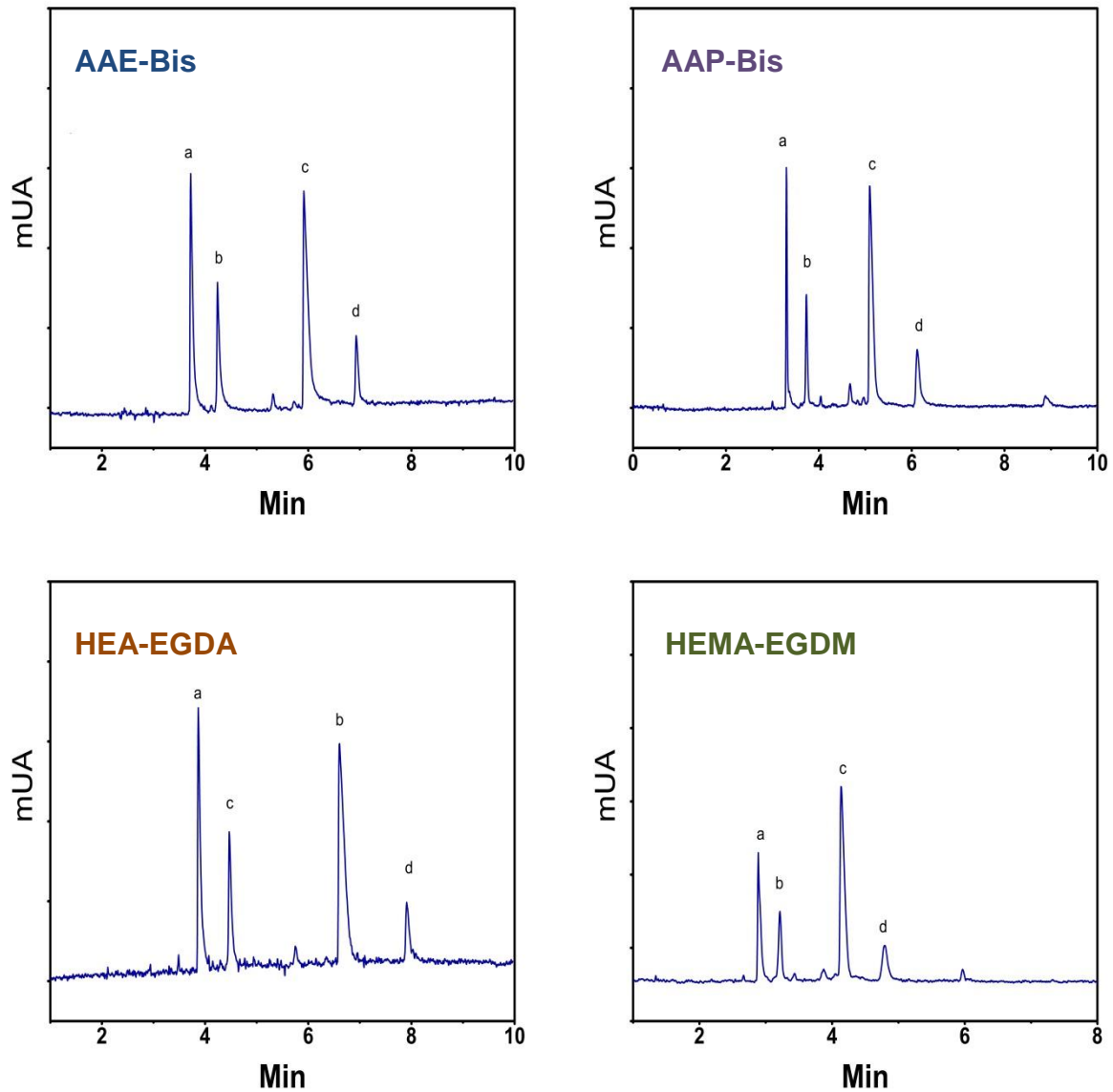


Figura 33. Separación de mezclas de péptidos en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas empleadas en la Figura 31. Solutos: (a) angiotensina-H₁, (b) angiotensina-H₂, (c) bradiquinina y (d) oxitocina

evaluadas, lo que sugiere una pobre polimerización de este caso. Estos resultados son consistentes con el análisis previo de este monómero (ver, por ejemplo, la Figura 16). Sin embargo, no se descarta que la polimerización de AAE-Bis sea útil para la separación de otras biomoléculas como péptidos, para el cual mostró buena eficiencia en la separación (ver Figura 33).

Las Figuras 34 a 36 comparan los cuatro recubrimientos sin agente entrecruzante con respecto a la separación de las mismas tres mezclas de proteínas. Comparados con los demás, los recubrimientos de HEMA y, en menor extensión, HEA exhiben los picos más altos y delgados para todas las mezclas. Igual que con los recubrimientos entrecruzados los péptidos exhiben muy buenos perfiles de separación, como se muestra en la Figura 37.

La Tabla 8 muestra las eficiencias del primer pico en la separación de proteínas básicas (Figuras 34 a 36) y el tercer pico (bradiquinina) en la separación de péptidos (Figura 37) para los recubrimientos no entrecruzados. Nótese que las mejores eficiencias se obtienen para los capilares modificados con HEMA y, en menor extensión, HEA. Los capilares recubiertos con AAE y AAP no exhibieron satisfactorias separaciones en la mayoría de la mezclas de proteínas evaluadas.

Para mostrar el efecto del entrecruzamiento sobre los polímeros, es necesario comparar cada uno de los monómeros con y sin agente entrecruzante para cada mezcla individual de proteínas. Con el fin de dar mayor claridad, estas comparaciones se muestran directamente en las Figuras C2 a C5 del Apéndice C. Obsérvese que para AAE el efecto de añadir Bis fue negativo en casi todas las mezclas (ver Figura C2). El efecto negativo del agente entrecruzante es mucho más claro en el caso de HEA y HEMA (Figuras C4 y C5 respectivamente). Igualmente claro es el efecto positivo de agregar Bis durante la polimerización de AAP (Figura C3).

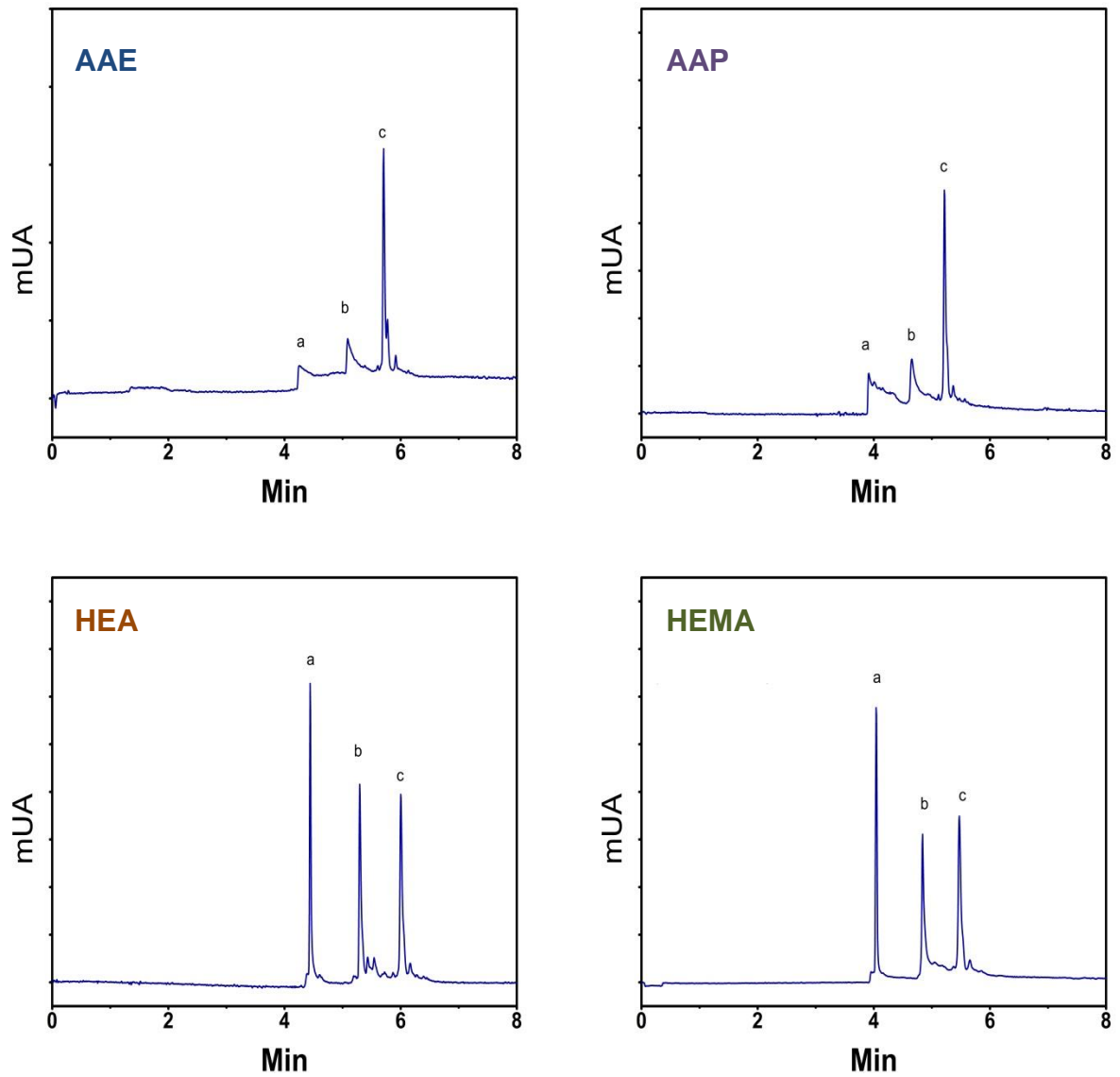


Figura 34. Separación de mezclas de proteínas en capilares polymerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos no entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31. Solutos: (a) lisozima, (b) ribonucleasa A y (c) α quimotripsinogeno.

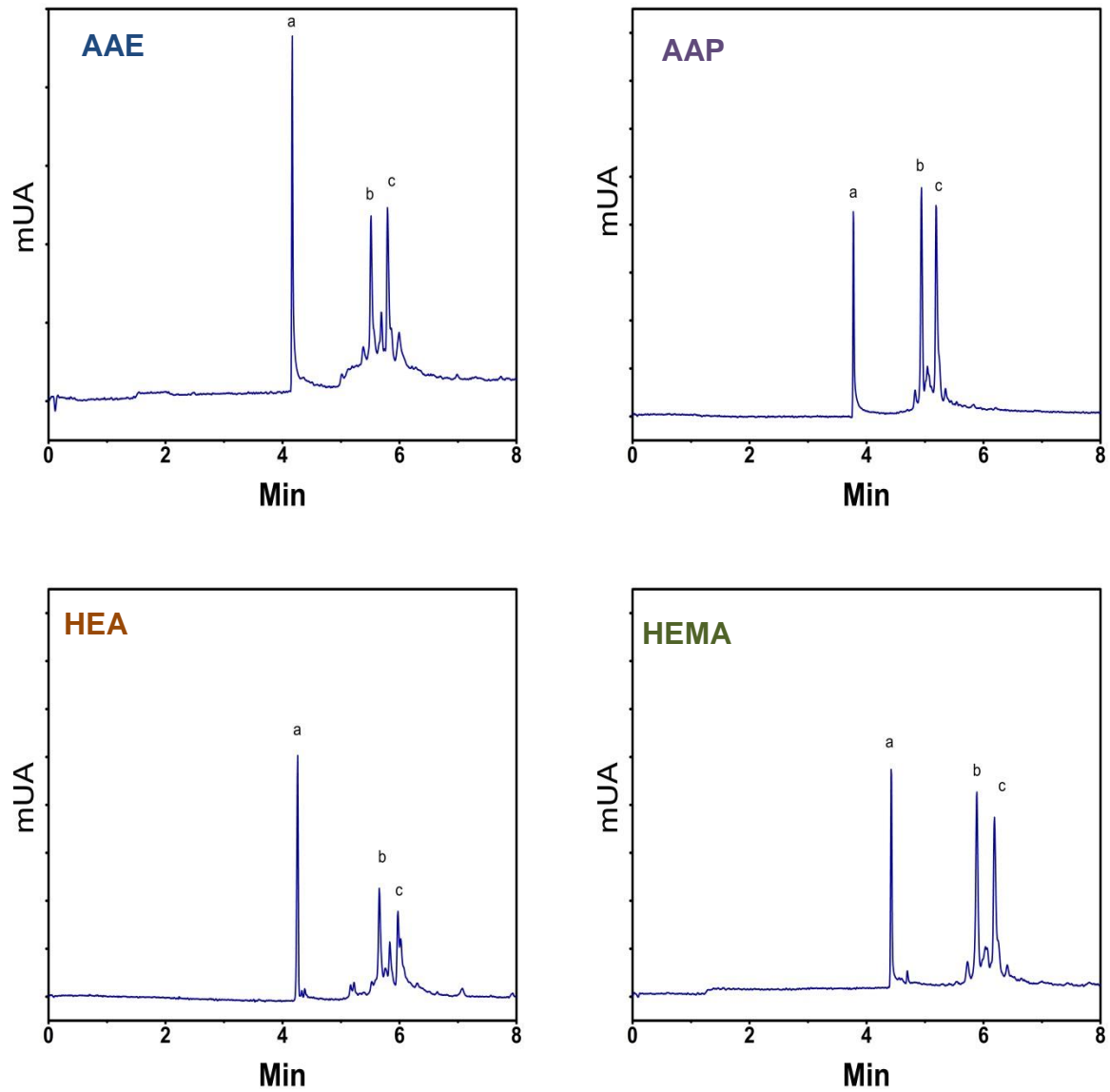


Figura 35. Separación de mezclas de proteínas en capilares polymerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos no entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31. Solutos: (a) citocromo C, bovino, (b) tripsinógeno y (c) α -quimotripsinógeno,

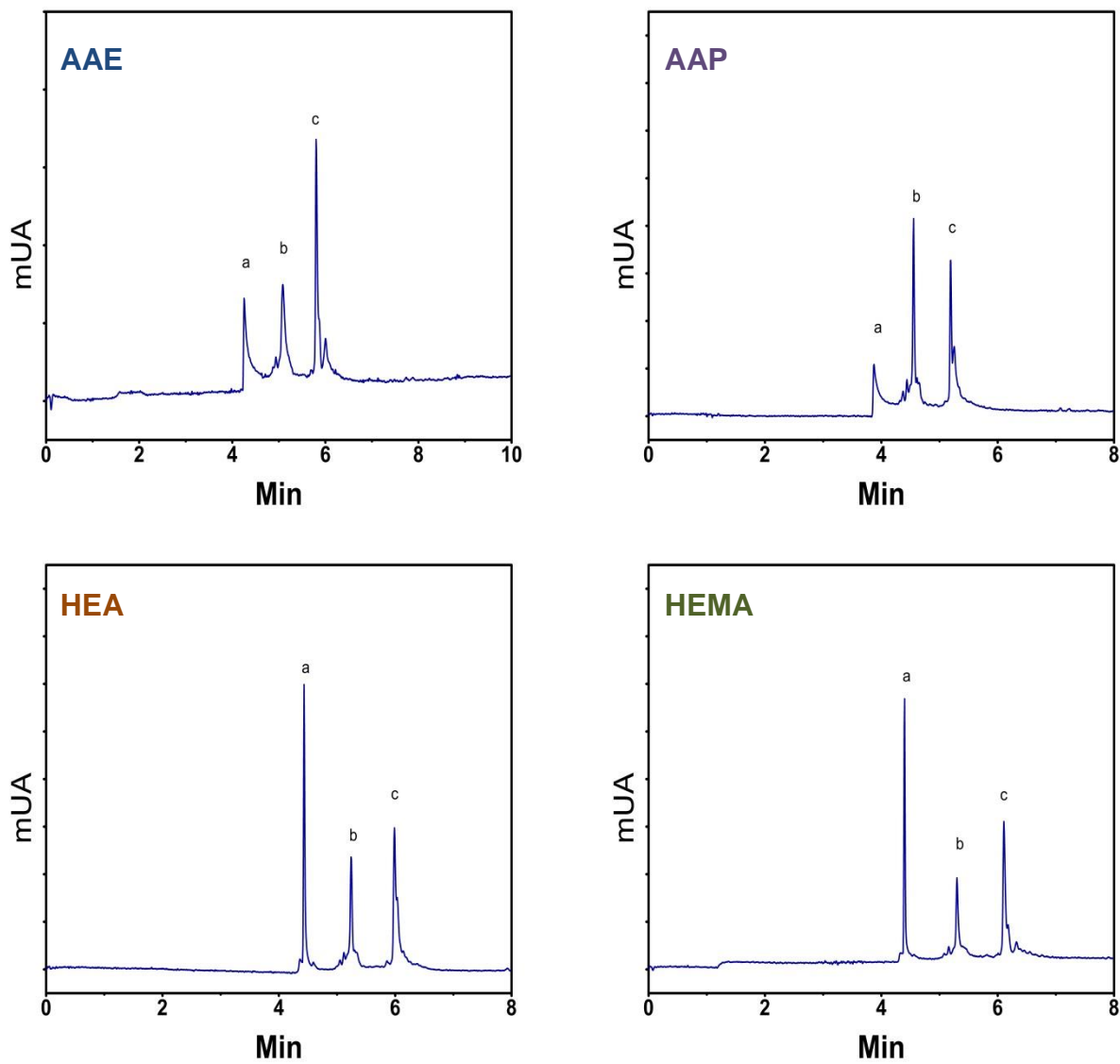


Figura 36. Separación de mezclas de proteínas en capilares polymerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos no entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31. Solutos: (a) lisozima, (b) tripsina y (c) α -quimotripsinogeno.

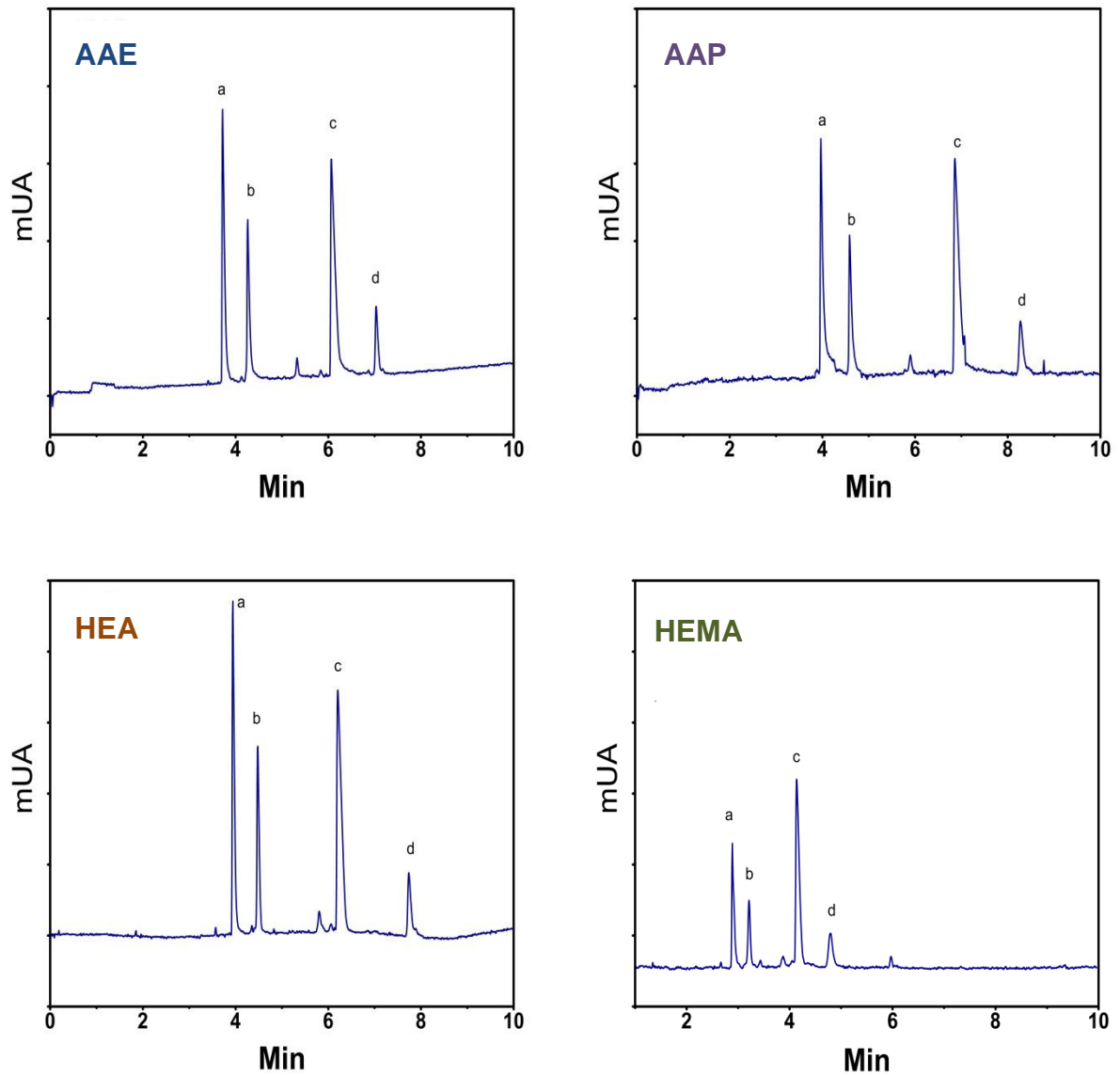


Figura 37. Separación de mezclas de proteínas en capilares polymerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos no entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31. Solutos: (a) angiotensina-H₁, (b) angiotensina-H₂, (c) bradiquinina y (d) oxitocina.

Tabla 8. Eficiencias de proteínas y péptidos separados a pH 3.7 en capilares con recubrimientos hidrofílicos no entrecruzados (n = 3).

Recubrimiento polimérico	Eficiencia ¹ (platos/m) × 10 ⁴			
	Figura 34	Figura 35	Figura 36	Figura 37
AAE	---	44±5	5±1	5.6±0.1
AAP	---	39.2±0.7	5.6±2.3	5.5±0.3
HEA	40.2±0.4	30±2	39±1	5.09±0.03
HEMA	32±5	29±1	41±4	6.75±0.09

¹Las eficiencias fueron calculadas para lisozima (Figuras 34 y 36), citocromo C, bovino (Figura 35) y bradiquinina (Figura 37).

En general, las separaciones obtenidas en la mayoría de los capilares modificados fueron exitosas, obteniéndose altas eficiencias que llegan en muchos casos a decimas de millones de platos teóricos. También se destaca la alta reproducibilidad de los tiempos de migración en la mayoría de las separaciones obtenidas. Esto se muestra en las Tablas 9 y 10. Puede observarse que, con algunas pocas excepciones, los tiempos de migración exhiben una variabilidad menor que 1 % en desviación estándar relativa. Con el propósito de visualizar el efecto de incorporar el polímero en la superficie, se añaden en el apéndice C6 electroferogramas correspondientes a la separación de dos mezclas de proteínas en un capilar nativo (no modificado). Puede notarse una mejorara considerable respecto aquellos modificados con las películas poliméricas.

Tabla 9. Precisión en tiempos de migración de proteínas y péptidos separados a pH 3.7 en capilares con recubrimientos hidrofílicos entrecruzados (n = 3).

Recubrimiento polimérico	Tiempo de migración, min (%RSD) ¹			
	Figura 30	Figura 31	Figura 32	Figura 33
AAE-Bis	---	3.33 (0.29)	---	5.92 (0.22)
AAP-Bis	4.09 (0.06)	3.93 (0.19)	4.05 (1.21)	5.11 (0.18)
HEA-EGDA	3.56 (0.52)	3.36 (0.68)	3.74 (0.34)	6.41 (3.10)
HEMA-EGDM	3.73 (0.11)	3.66 (0.22)	3.76 (0.32)	4.79 (10.8)

¹Los tiempos de migración corresponden a lisozima (Figuras 30 y 32), citocromo C, bovino (Figura 31) y bradiquinina (Figura 33).

Tabla 10. Precisión en tiempos de migración de proteínas y péptidos separados a pH 3.7 en capilares con recubrimientos hidrofílicos no entrecruzados (n = 3).

Recubrimiento polimérico	Tiempo de migración, min (%RSD) ¹			
	Figura 34	Figura 35	Figura 36	Figura 37
AAE	---	4.18 (0.25)	4.26 (0.51)	6.07 (1.14)
AAP	---	3.78 (0.04)	3.87 (0.13)	6.79 (0.95)
HEA	4.42 (0.71)	4.26 (0.07)	4.43 (0.07)	6.04 (2.47)
HEMA	4.19 (3.35)	4.33 (0.77)	4.29 (2.15)	5.08 (1.44)

¹Los tiempos de migración corresponden a lisozima (Figuras 34 y 36), citocromo C, bovino (Figura 35) y bradiquinina (Figura 37).

6. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

El presente proyecto desarrolló una variedad de películas poliméricas hidrofílicas confinadas a la superficie de sílica, mediante un esquema sintético que involucró el anclaje previo del iniciador BMP seguido por la polimerización ATRP de varios monómeros sobre este. La inmovilización del iniciador se llevó a cabo en dos pasos: primero se anclan moléculas de propanol sobre la superficie, y luego se esterifican estas con el bromuro de BMP. Si bien la modificación con grupos propanol alcanzó coberturas muy altas, en la reacción esterificación solo tres de cada diez grupos propanol inmovilizaron un grupo iniciador BMP. A pesar de la baja densidad del iniciador BMP anclado, se obtuvieron películas poliméricas que permitieron la separación exitosa de varias mezclas de proteínas básicas, alcanzándose eficiencias próximas al millón de platos teóricos por metro y muy buena reproducibilidad de los tiempos de migración. Además de las condiciones específicas de reacción (catalizador, solvente, etc.), el efecto de incorporar un agente entrecruzante a la solución de monómero dependió mayormente de la naturaleza de este, siendo positivo en el caso de las amidas AAP y, en menor grado, AAE, y negativo en el caso de los ésteres HEA y HEMA. Los recubrimientos que obtuvieron las mejores separaciones de proteínas fueron los polímeros de HEMA sin entrecruzar y AAP entrecruzado con Bis.

A pesar que se lograron grandes progresos hacia la obtención de recubrimientos *non-fouling*, dos aspectos deben resolverse antes de obtener un capilar completamente libre de adsorción de proteínas. La eficiencia en la inmovilización del grupo iniciador BMP –o de cualquier otro igualmente o más efectivo que este– deberá mejorarse de tal manera que pueda haber un control óptimo sobre la polimerización ATRP de los monómeros más promisorios, AAP y HEMA. Este trabajo se iniciará en un futuro muy próximo. El otro aspecto tiene que ver con la verificación que los recubrimientos obtenidos en este proyecto son de verdad más estables hidrolíticamente que los que se encuentran en la literatura o en el mercado. Este trabajo se encuentra bajo desarrollo en la actualidad y parece que

el monómero AAP satisface las expectativas asociadas con la N-sustitución en su estructura de amida. Pero ese es el objeto de otro reporte de nuestro grupo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. S. C. Beale, *Analytical Chemistry*, 1998, **70**, 279-300.
2. K. D. Altria and D. Elder, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1023**, 1-14.
3. M. Geiger, A. L. Hogerton and M. T. Bowser, *Analytical Chemistry*, 2011, **84**, 577-596.
4. C. L. Copper, *Journal of Chemical Education*, 1998, **75**, 343.
5. A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods fundamentals and applications*, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas at Austin, 1980.
6. J. E. Sandoval and S.-M. Chen, *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 2771-2775.
7. B. A. Williams and G. Vigh, *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 1174-1180.
8. M. C. Montes, C. van Amen, J. J. Pesek and J. E. Sandoval, *Journal of Chromatography A*, 1994, **688**, 31-45.
9. M. Pursch and L. C. Sander, *Journal of Chromatography A*, 2000, **887**, 313-326.
10. N. W. Frost, M. Jing and M. T. Bowser, *Analytical Chemistry*, 2010, **82**, 4682-4698.
11. B. w. Buszewski, D. Berek, J. Garaj, I. Novák and Z. w. Suprynowicz, *Journal of Chromatography A*, 1988, **446**, 191-201.
12. F. Baeuml and T. Welsch, *Journal of Chromatography A*, 2002, **961**, 35-44.
13. J. D. Hayes and A. Malik, *Analytical Chemistry*, 2001, **73**, 987-996.
14. C. A. Rimmer, L. C. Sander, S. A. Wise and J. G. Dorsey, *Journal of Chromatography A*, 2003, **1007**, 11-20.
15. J. E. Sandoval and J. J. Pesek, *Analytical Chemistry*, 1991, **63**, 2634-2641.
16. J. E. Gomez and J. E. Sandoval, *Analytical Chemistry*, 2010, **82**, 7444-7451.
17. J.-L. Chen, in *Electrophoresis*, 2009, vol. 30, pp. 3855-3862.

18. J. Planeix, B. Coq, L. De Menorval and F. Medina, *Chemical Communications*, 1996, **17**, 2087-2088.
19. C. Courtois, C. Allais, T. Constantieux, J. Rodriguez, S. Caldarelli and C. Delaurent, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, **382**, 1345-1354.
20. M. J. Wirth and H. O. Fatunmbi, *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 822-826.
21. A. Feldmann, U. Claußnitzer and M. Otto, *Journal of Chromatography B*, 2004, **803**, 149-157.
22. W. Tang and K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2007, **40**, 1858-1863.
23. K. Matyjaszewski and J. Xia, *Chemical Reviews*, 2001, **101**, 2921-2990.
24. X. Ren, Y. Shen and M. L. Lee, *Journal of Chromatography A*, 1996, **741**, 115-122.
25. L. Xu, X.-Y. Dong and Y. Sun, *Biochemical Engineering Journal*, 2010, **53**, 137-142.
26. L. B. Carneiro, J. Ferreira, M. J. L. Santos, J. P. Monteiro and E. M. Giroto, *Applied Surface Science*, 2011, **257**, 10514-10519.
27. K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2012, **45**, 4015-4039.
28. J.-S. Wang and K. Matyjaszewski, *Journal of the American Chemical Society*, 1995, **117**, 5614-5615.
29. J.-S. Wang and K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 1995, **28**, 7901-7910.
30. M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto and T. Higashimura, *Macromolecules*, 1995, **28**, 1721-1723.
31. J. Queffelec, S. G. Gaynor and K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2000, **33**, 8629-8639.
32. H. Fischer, *Chemical Reviews*, 2001, **101**, 3581-3610.
33. W. Tang, Y. Kwak, W. Braunecker, N. V. Tsarevsky, M. L. Coote and K. Matyjaszewski, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 10702-10713.
34. Z. Guan, T. Pintauer and K. Matyjaszewski, in *Metal Catalysts in Olefin Polymerization*, Springer Berlin Heidelberg, 2009, vol. 26, pp. 221-251.

35. M. Ouchi, T. Terashima and M. Sawamoto, *Chemical Reviews*, 2009, **109**, 4963-5050.
36. X. Huang, L. J. Doneski and M. J. Wirth, *Analytical Chemistry*, 1998, **70**, 4023-4029.
37. J. Xu, L. Yang, Z. Luo and Y. Wang, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 1713-1720.
38. M. N. Albarghouthi, T. M. Stein and A. E. Barron, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 1166-1175.
39. S. N. Krylov and N. J. Dovichi, *Analytical Chemistry*, 2000, **72**, 111-128.
40. M. N. Albarghouthi, B. A. Buchholz, P. J. Huiberts, T. M. Stein and A. E. Barron, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 1429-1440.
41. P. G. Righetti and C. Gelfi, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, **699**, 63-75.
42. M. Chiari, M. Nesi, J. E. Sandoval and J. J. Pesek, *Journal of Chromatography A*, 1995, **717**, 1-13.
43. G. Bayramoğlu, M. Yilmaz and M. Y. Arıca, *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **13**, 35-42.
44. M. Chiari, C. Micheletti, M. Nesi, M. Fazio and P. G. Righetti, *Electrophoresis*, 1994, **15**, 177-186.
45. T. Tsukagoshi, Y. Kondo and N. Yoshino, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, **54**, 101-107.
46. S. Abraham, S. Brahim, K. Ishihara and A. Guiseppi-Elie, *Biomaterials*, 2005, **26**, 4767-4778.
47. L. Gao and S. Liu, *Analytical Chemistry*, 2004, **76**, 7179-7186.
48. H. Gao, A. Miasnikova and K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2008, **41**, 7843-7849.
49. H. Gao and K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2008, **41**, 1118-1125.
50. A. Li, E. M. Benetti, D. Tranchida, J. N. Clasohm, H. Schönherr and N. D. Spencer, *Macromolecules*, 2011, **44**, 5344-5351.
51. J. E. Gómez and J. E. Sandoval, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 381-392.

52. C. Zhang and R. M. Laine, *Journal of the American Chemical Society*, 2000, **122**, 6979-6988.
53. A. Provatas, M. Luft, J. C. Mu, A. H. White, J. G. Matison and B. W. Skelton, *Journal of Organometallic Chemistry*, 1998, **565**, 159-164.
54. R. Duchateau, *Chemical Reviews*, 2002, **102**, 3525-3542.
55. E. A. Quadrelli and J.-M. Basset, *Coordination Chemistry Reviews*, 2010, **254**, 707-728.
56. J. E. Gómez, F. H. Navarro and J. E. Sandoval, *Electrophoresis*, 2014, **35**, 2579-2586.
57. S. J. Oh, D. R. Kinney, W. Wang and P. L. Rinaldi, *Macromolecules*, 2002, **35**, 2602-2607.
58. J. E. Sandoval, *Journal of Chromatography A*, 1999, **852**, 375-381.
59. M. Ma and R. M. Hill, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2006, **11**, 193-202.
60. K. K. Unger, Porous silica. Its properties and use as support in column liquid chromatography, in *Journal of Chromatography Library*, Elsevier, 1979, vol. Volume 16, pp. 57-146.
61. P. M. Claesson, E. Blomberg, J. C. Fröberg, T. Nylander and T. Arnebrant, *Advances in Colloid and Interface Science*, 1995, **57**, 161-227.
62. X. Huang, J. M. Kovaleski and M. J. Wirth, *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 4119-4123.
63. R. W. P. Fairbank and M. J. Wirth, *Analytical Chemistry*, 1997, **69**, 2258-2261.
64. J. H. Espinal, J. E. Gómez and J. E. Sandoval, *Electrophoresis*, 2013, **34**, 1141-1147.
65. H. Stutz, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 2032-2061.
66. G. J. ENRIQUE, Doctor en Ciencias química, Universidad del Valle, 2013.
67. Z. Bao, M. L. Bruening and G. L. Baker, *Macromolecules*, 2006, **39**, 5251-5258.
68. J. M. Bennett and J. H. Dancy, *Applied Optics*, 1981, **20**, 1785-1802.

69. J. Salvi, S. Fernandez, T. Pribanic and X. Llado, *Pattern Recognition*, 2010, **43**, 2666-2680.
70. M. Losurdo, K. Hingerl and E. Irene, in *Ellipsometry at the Nanoscale*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 1-30.
71. C. Zhao and J. Zheng, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 4071-4079.
72. M. D. Miller, G. L. Baker and M. L. Bruening, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1044**, 323-330.
73. S. Chen, L. Li, C. Zhao and J. Zheng, *Polymer*, 2010, **51**, 5283-5293.
74. J. C. Hower, M. T. Bernards, S. Chen, H.-K. Tsao, Y.-J. Sheng and S. Jiang, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, **113**, 197-201.
75. H. Liu, M. Li, Z.-Y. Lu, Z.-G. Zhang and C.-C. Sun, *Macromolecules*, 2009, **42**, 2863-2872.
76. H. Ma, J. a. He, X. Liu, J. Gan, G. Jin and J. Zhou, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2010, **2**, 3223-3230.
77. J.-B. Kim, W. Huang, M. D. Miller, G. L. Baker and M. L. Bruening, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2003, **41**, 386-394.
78. A. Cifuentes, M. A. Rodríguez and F. J. García-Montelongo, *Journal of Chromatography A*, 1996, **742**, 257-266.
79. A. Puerta, J. Axén, L. Söderberg and J. Bergquist, *Journal of Chromatography B*, 2006, **838**, 113-121.
80. Y.-F. Huang, C.-C. Huang, C.-C. Hu and H.-T. Chang, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 3503-3522.
81. T. McLellan, *Analytical Biochemistry*, 1982, **126**, 94-99.

APÉNDICE A

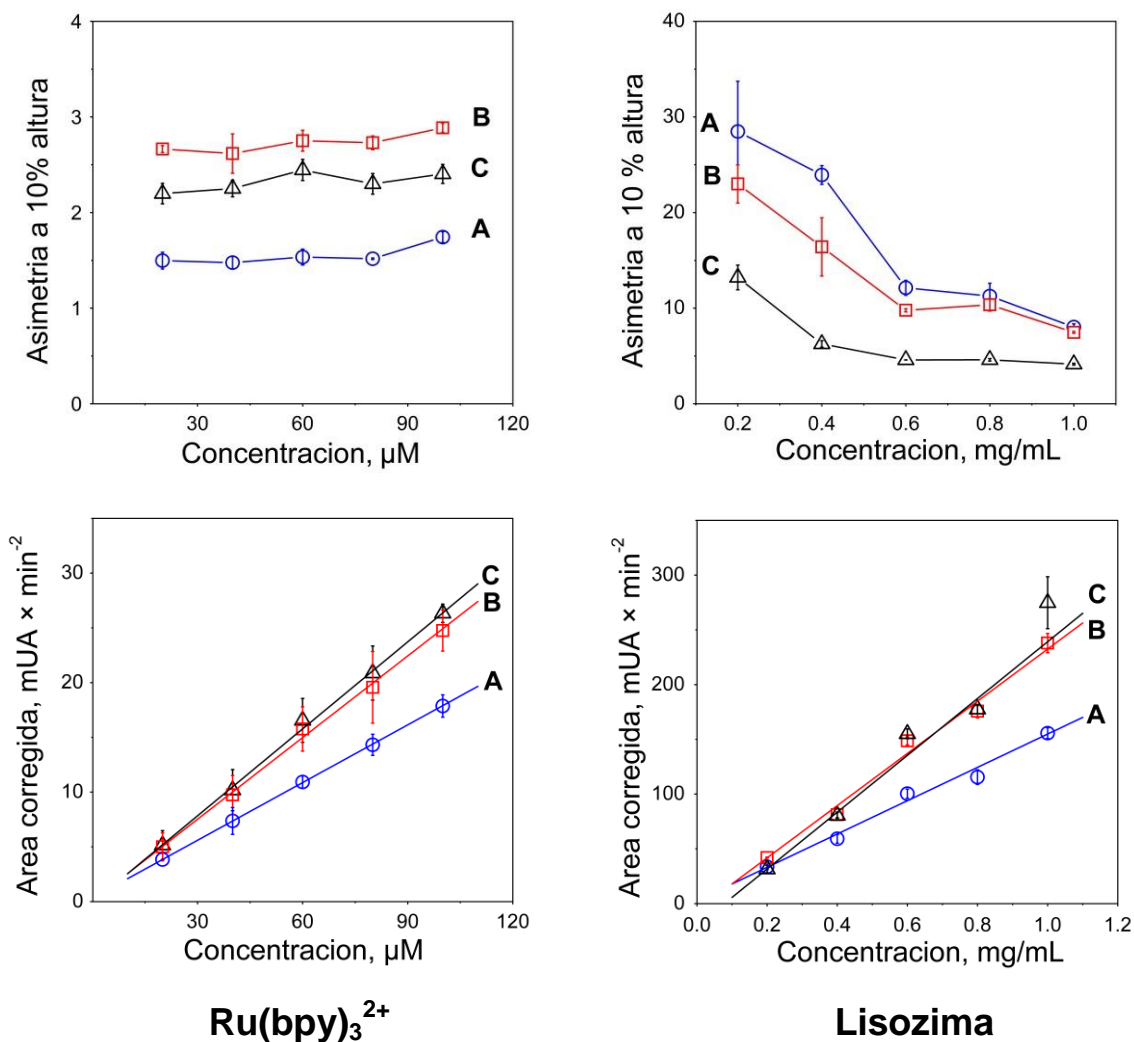
Efecto de la concentración de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y lisozima sobre su perfil CE

Figura A 1. Efecto de la concentración de solutos sobre la asimetría y área corregida del pico del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (lado izquierdo) y lisozima (lado derecho) en capilar (A) sin modificar, (B) hidrurado (C) propanolado. Todos de un mismo lote y dimensiones al igual que en la Figura 12.

APÉNDICE B

NMR ¹³C CP-MAS de sílica particulada recubierta con poliAAE y poliHEMA

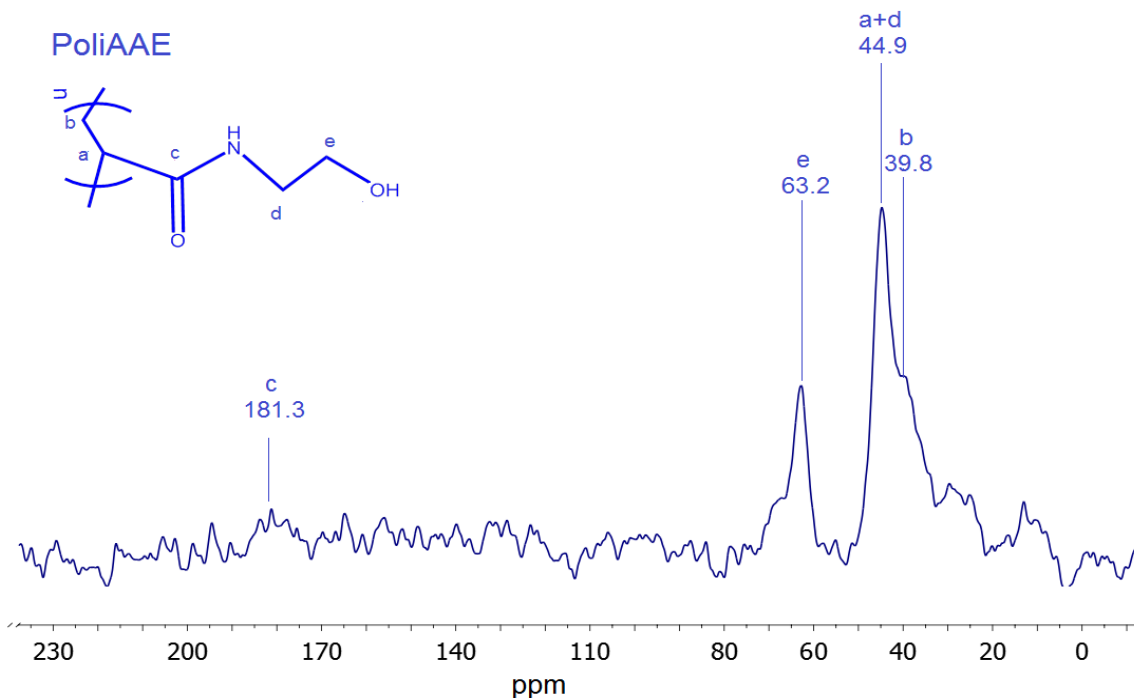


Figura B 1. Espectro poliAAE anclado sobre sílica (Nucleosil™)

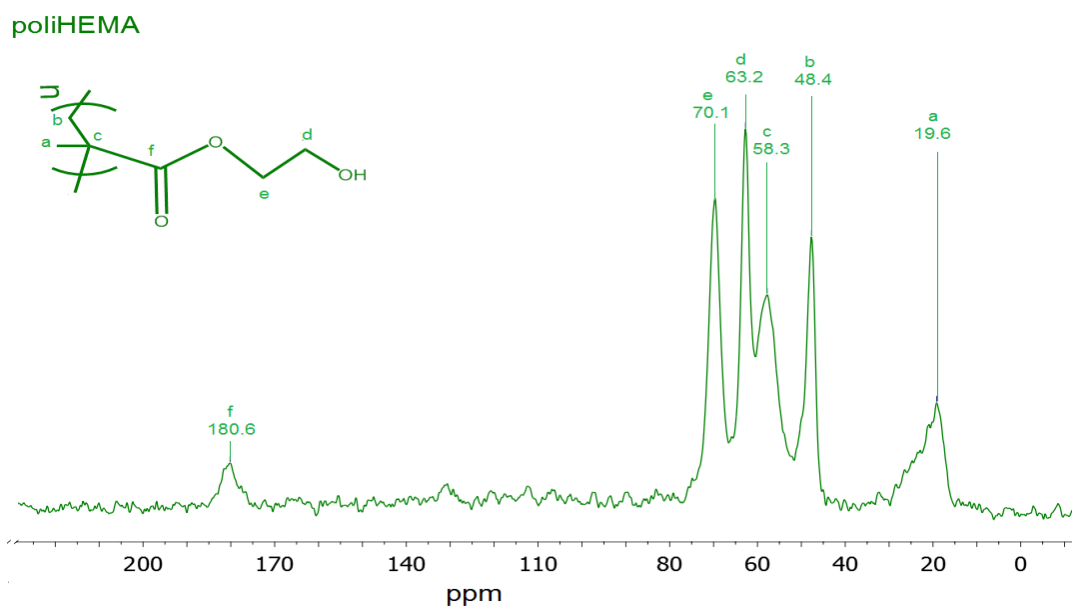


Figura B 2. Espectro de poliHEMA anclado sobre sílica (Nucleosil™)

APÉNDICE C

SEPARACIONES CE DE PROTEÍNAS

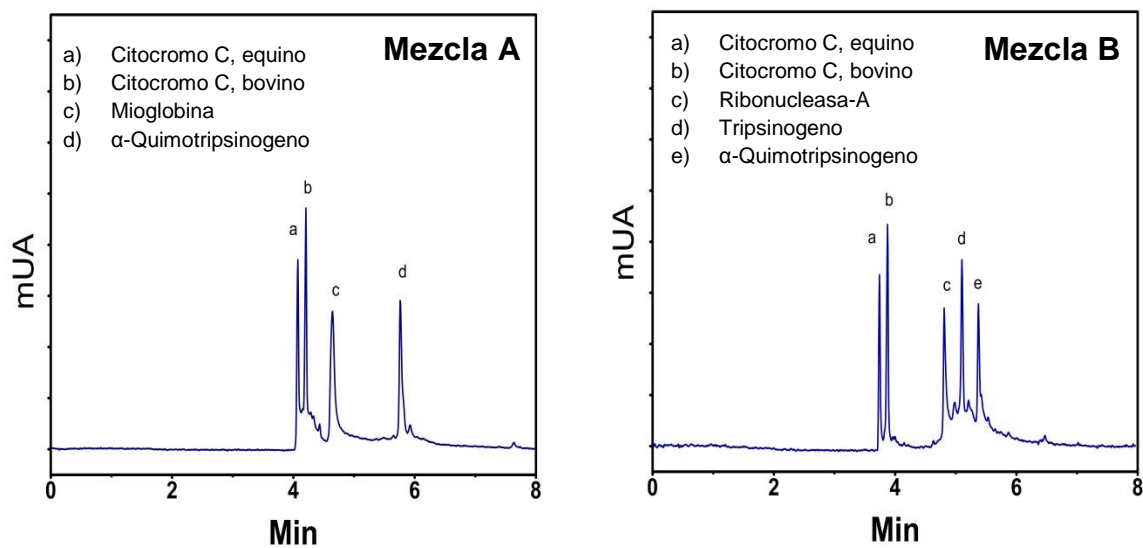


Figura C 1. Electroferogramas para la separación de mezclas de proteínas básicas, en capilar polimerizado con AAP-Bis. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31.

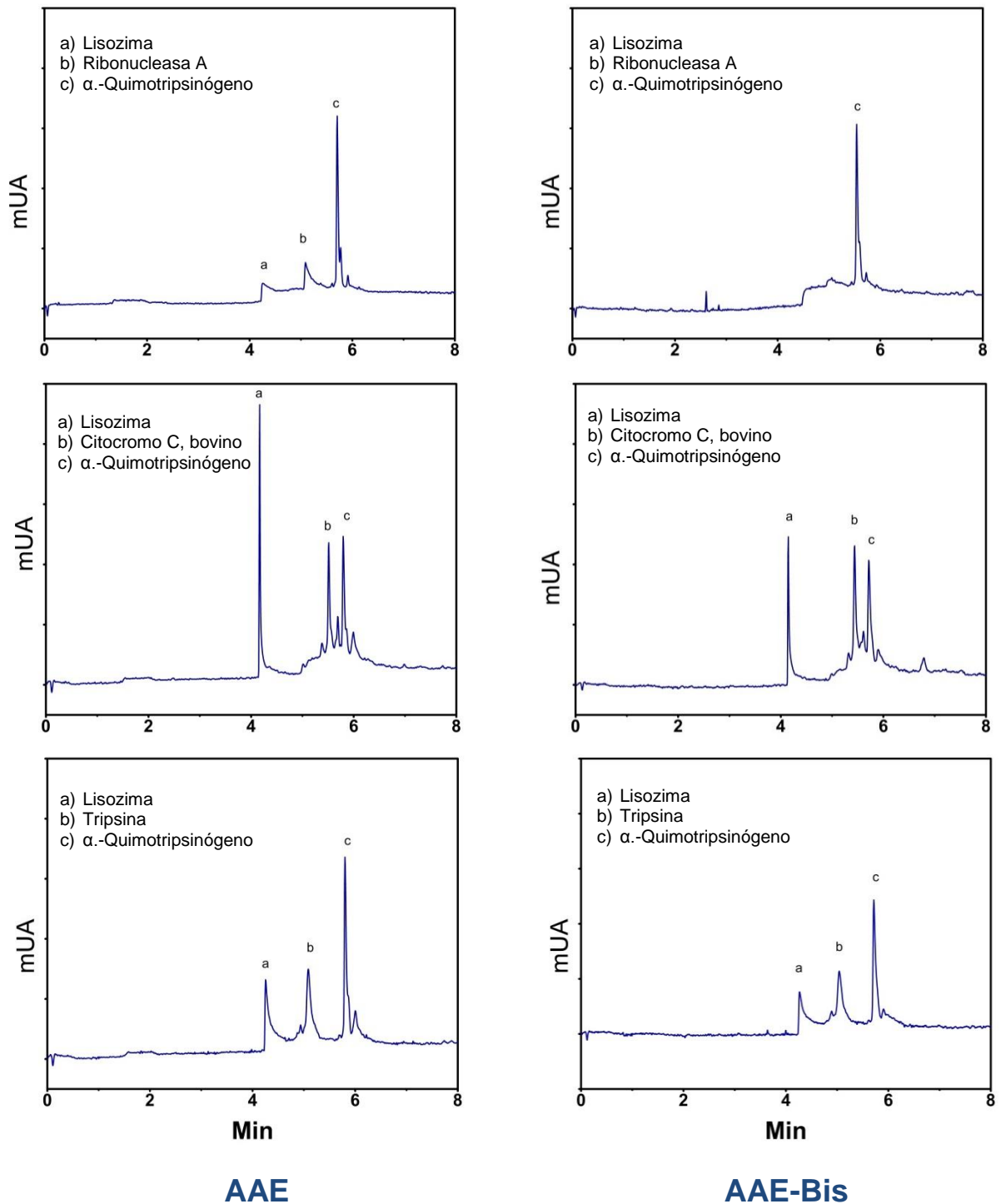


Figura C 2. Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos de AAE entrecruzados y no entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31.

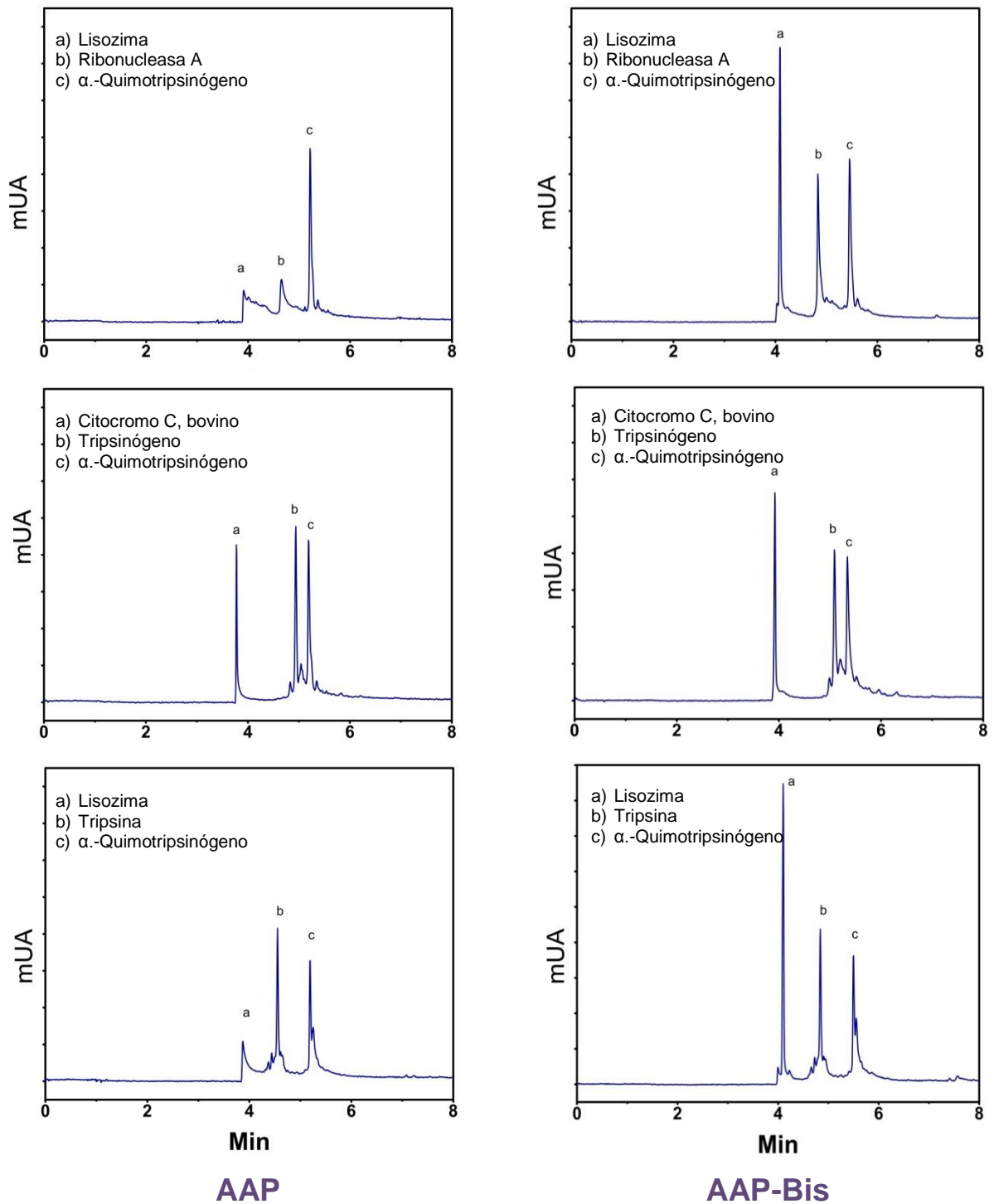


Figura C 3. Separación de mezclas de proteínas en capilares polimerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos de AAP entrecruzados y no entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31.

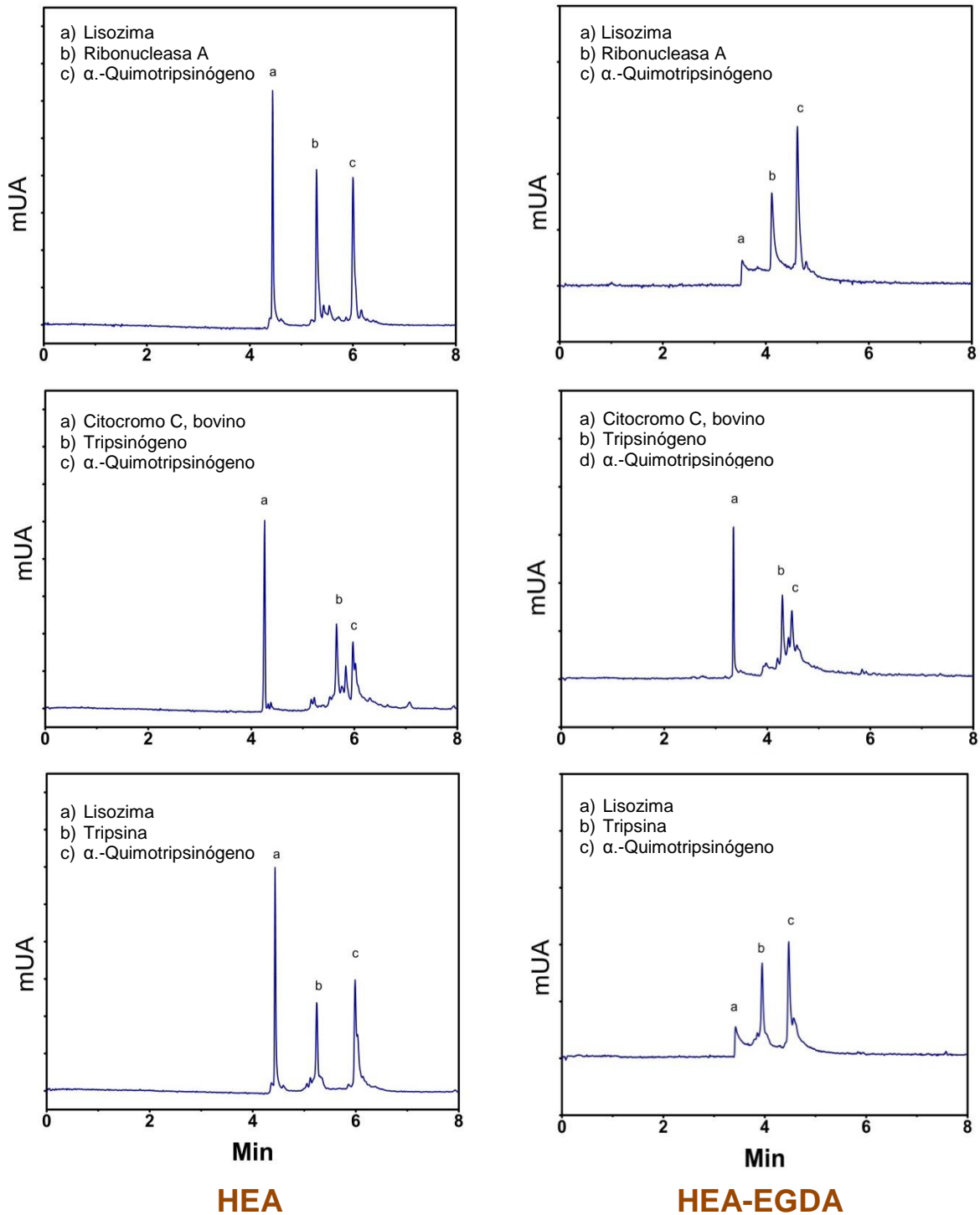


Figura C 4. Separación de mezclas de proteínas en capilares polymerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos de HEA entrecruzados y no entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31.

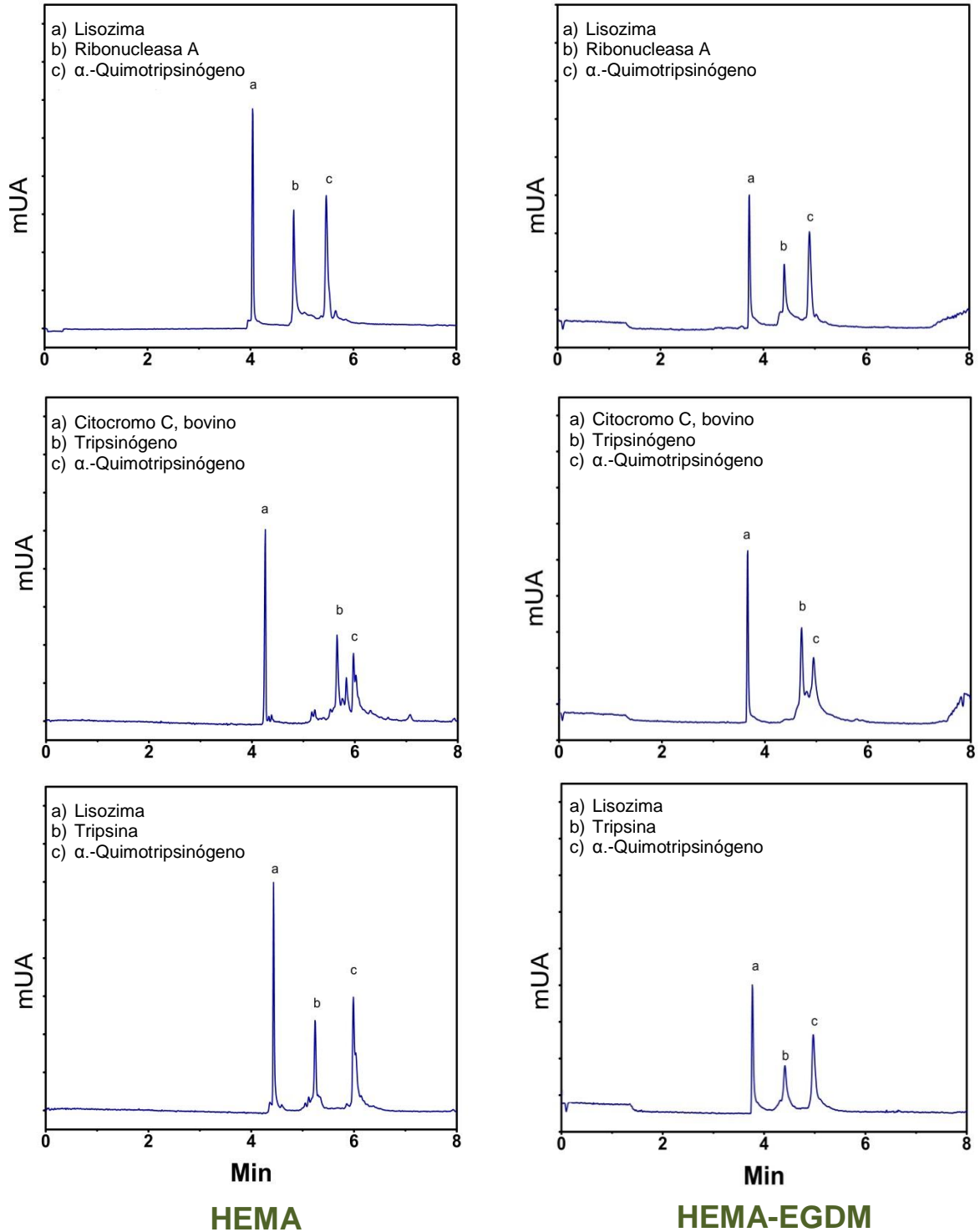


Figura C 5. Separación de mezclas de proteínas en capilares polymerizados recubiertos con cuatro polímeros hidrofílicos de HEMA entrecruzados y no entrecruzados. Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31.

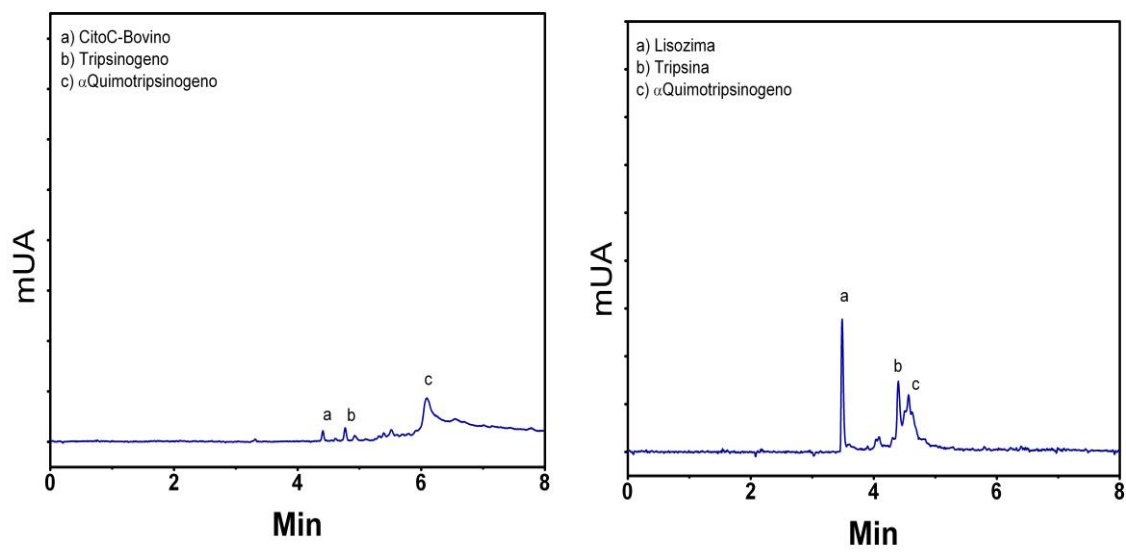


Figura C 6. Separación de mezclas de proteínas en capilares no modificados (nativos). Las condiciones CE son las mismas que fueron empleadas en la Figura 31.