

## Fases estacionarias monolíticas poliméricas y su maridaje con técnicas de separación miniaturizadas y sistemas de microextracción

María Vergara, Enrique Carrasco, María Jesús Lerma, Ernesto Simó, José Manuel Herrero

Departamento de Química Analítica, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot (Valencia)

e-mail: [jmherrer@uv.es](mailto:jmherrer@uv.es)

### 1. Introducción

Desde su aparición hace casi dos décadas, el desarrollo de soportes monolíticos como fases estacionarias en técnicas cromatográficas y de tratamiento de muestra se ha ido extendiendo a diversas áreas de aplicación, y actualmente continúa siendo un tema de interés en el ámbito de las ciencias separativas como ponen de manifiesto el alto número de publicaciones y comunicaciones originadas sobre este tema [1]. El interés por estos materiales se justifica por su alta porosidad y permeabilidad, versatilidad, reducción de tiempos de análisis, bajo consumo de reactivos y la posibilidad de unificar su empleo en HPLC capilar/nano como en electrocromatografía capilar (CEC) [1, 2]. Además, los materiales monolíticos no requieren de fritas, evitándose así los problemas inherentes a las columnas particuladas, tales como el tedioso procedimiento de empaquetamiento, y la indeseable formación de burbujas en técnicas miniaturizadas como la CEC.

Atendiendo a su naturaleza, los materiales monolíticos pueden clasificarse en dos grandes grupos: inorgánicos (basados en sílice) y orgánicos (basados en polímeros de acrilamida, metacrilato o estireno, entre otros). Sin embargo, la síntesis de los primeros no es sencilla y requiere un control exhaustivo de todo el proceso y, al igual que los materiales de sílice particulados, presentan un rango de estabilidad de pH (pH 2-7). Además, el tratamiento térmico asociado a su preparación hace que el principal uso de los monolitos de sílice se haya reducido al formato capilar, siendo difícil su extensión a técnicas de microextracción en fases sólida.

Por su parte, la preparación de monolitos poliméricos es sencilla y se lleva a cabo normalmente *in situ* vía polimerización radicalaria. La mezcla de polimerización es una combinación de monómeros entre los que se encuentra un agente entrelazante o *cross-linker*, una mezcla porogénica de disolventes y un iniciador radicalario. La polimerización se lleva a cabo en la mayoría de los casos por calentamiento en un baño u horno [2], por la acción de iniciadores químicos [3] o mediante radiación UV [4]. Gracias al control que puede ejercerse sobre el proceso de polimerización, es posible optimizar las propiedades morfológicas de los monolitos resultantes y, por tanto, la velocidad de flujo, la eficacia y la retención de la fase estacionaria. Además, la gran variedad de

monómeros disponibles, así como la posibilidad de su posterior funcionalización, permite ajustarse a las interacciones específicas necesarias para conseguir una retención selectiva de los analitos de interés.

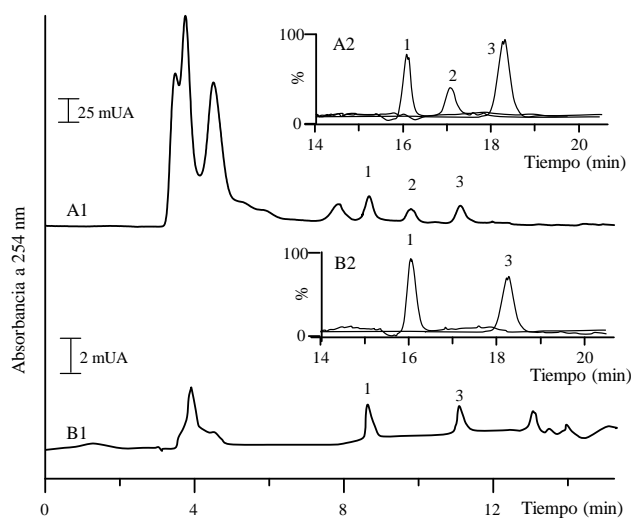
Pese a las buenas prestaciones de estos materiales, sus áreas superficiales son relativamente bajas comparadas con sus homólogos de sílice, debido a la ausencia de una estructura micro- o mesoporosa adecuada, lo cual da lugar a una menor capacidad de carga y retenciones más débiles en aplicaciones cromatográficas. Con el fin de contrarrestar esta limitación, se han propuesto diferentes estrategias como el empleo de nuevas condiciones de polimerización, polímeros hiperentrelazados [5], monolitos híbridos de sílice-orgánicos [6] o la incorporación de nano/micro-materiales [7]. Estas aproximaciones pueden no sólo mejorar el área superficial de los sorbentes, sino incluso permiten modificar la selectividad. En este sentido, en los últimos años, nuestro grupo de investigación ha trabajado intensamente en la incorporación de nanopartículas (NPs) a monolitos orgánicos, resultando ser una forma efectiva y prometedora de incrementar la relación superficie/volumen de éstos, así emplearlos como plataforma para posteriores modificaciones químicas de su superficie [8].

A continuación, se describen las principales aportaciones y estrategias que nuestro grupo de investigación ha realizado en este contexto con el fin de potenciar el maridaje de estas nuevas fases híbridas o *composites* con prestaciones mejoradas en el ámbito de las técnicas de (electro)separación capilar y de (micro)extracción en fase sólida.

### 2. Integración de fases monolíticas poliméricas en técnicas de separación miniaturizadas

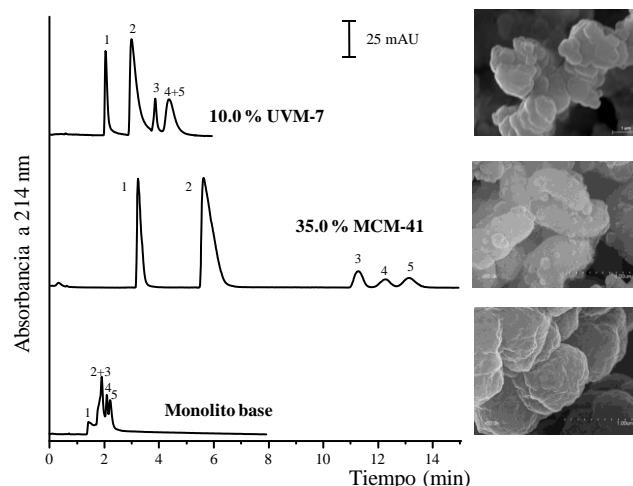
Hasta la fecha, las columnas monolíticas poliméricas han demostrado ser unas excelentes fases estacionarias para la rápida separación en HPLC capilar/nano y CEC de macromoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos y polímeros sintéticos [1]. Sin embargo, su extensión a moléculas pequeñas en matrices complejas ha sido poco explorada [7]. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de separación de parabenos en orina y suero empleando columnas monolíticas basadas en butil metacrilato (BMA) y detección con espectrometría de masas (MS) [9]. Aunque el método permitió obtener unos límites de detección

(LODs) bajos (de 0,011 a 0,022 ng mL<sup>-1</sup>), los valores de capacidad de pico del monolito fueron inferiores a los obtenidos por columnas particuladas de diámetros menores a 3,5 µm.



**Figura 1.** Separación de parabenos en muestras de orina (A) y suero (B) usando una columna de BMA. Los insertos muestran para cada compuesto las masas utilizadas en modo *Multiple Reaction Monitoring*. Picos: metil parabeno (1), etil parabeno (2) y propil parabeno (3). (De ref. 9).

Para mejorar las prestaciones cromatográficas de estas fases estacionarias, se han desarrollado estrategias basadas en la introducción de NPs en los lechos monolíticos mediante la simple adición de las mismas a la mezcla de polimerización antes de que ésta tenga lugar. Además, para minimizar o evitar los problemas de sedimentación de NPs en la mezcla de polimerización, se recurrió al empleo de radiación UV como modo de iniciación, debido al rápido tiempo de polimerización (10-15 min), garantizando así la homogeneidad de los lechos preparados. Así pues, en el grupo se han preparado fases estacionarias híbridas utilizando diversos tipos de nanomateriales tales como nanotubos de carbono [10], NPs de Ag [11], magnéticas [12], de sílice mesoporosa [13] y de redes organometálicas [14]. En todos los casos, las fases diseñadas proporcionaron una exaltación de la retención de moléculas pequeñas y una mejora de la eficacia. En la Figura 2 se muestra una separación de ácidos benzoicos con monolitos híbridos preparados con dos tipos de NPs de sílice mesoporosa: MCM-41 y UVM-7. Como puede apreciarse las columnas conteniendo MCM-41 (a contenidos del 35% en peso) condujeron a una mejor separación que aquellas obtenidas con monolitos preparados con UVM-7. Además, las columnas de MCM-41 proporcionaron valores de eficacia cercanos a los 140.000 platos teóricos. El aumento de retención y eficacia observado puede explicarse en base a la mayor rugosidad de los glóbulos (mayor mesoporosidad y área superficial) presente en los monolitos preparados con MCM-41 comparados con los de UVM-7 y los del monolito control (sin adición de NPs) (véase las fotografías SEM correspondientes).



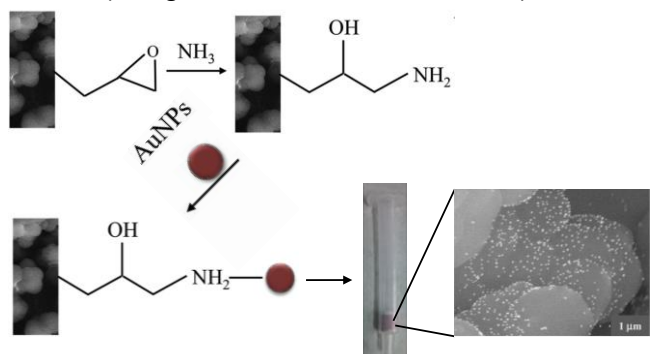
**Figura 2.** Separación de ácidos benzoicos usando monolito control y monolitos híbridos conteniendo 35 y 10% en peso de los materiales MCM-41 o UVM-7. Fotografías SEM de las columnas diseñadas. Picos: ácido ftálico (1), ácido salicílico (2), tiourea (3), ácido 2-yodobenzoico (4) y ácido benzoico (5). (De ref. 13).

### 3. Integración de materiales poliméricos en sistemas de microextracción en fase sólida

Desde hace casi dos décadas, en la bibliografía se encuentran numerosos estudios en los que se hace uso de fases monolíticas poliméricas sintetizadas en capilares de sílice fundida (d.i. < 250 µm) para HPLC capilar/nano y CEC. Por el contrario, sólo en los últimos años se han descrito aplicaciones en el ámbito de la (micro)extracción en fase sólida (microSPE) [15]. Entre los motivos que han frenado el desarrollo de aplicaciones competitivas en SPE, se encuentra, por un lado, la baja capacidad de carga de los monolitos orgánicos anteriormente señalada. Por otro lado, la preparación de dichos monolitos en el interior de formatos off-line tales como cartuchos o jeringas, punta de pipeta, o minicolumnas para centrifuga, entre otros, implica superar dos dificultades: conseguir un lecho homogéneo y enlazarlo covalentemente a la pared interior del soporte. En este sentido, en nuestro grupo se han descrito procedimientos de fotoinjerto (*photografting*) destinados a realizar una vinilización previa de la superficie del polipropileno (material habitualmente utilizado en estos formatos) facilitando así el anclaje posterior del monolito [16].

En lo relativo a la preparación de sorbentes capaces de exhibir una elevada capacidad de carga y una alta selectividad, la preparación de monolitos híbridos o *composites* puede dar respuesta a estas demandas. Sin embargo, en este caso, la incorporación de NPs se realizará mediante otra estrategia consistente en el anclaje de estos nanomateriales sobre la propia superficie del monolito ya formado. En esta aproximación, a diferencia de la comentada en el apartado anterior, las NPs no quedan mayoritariamente embebidas en la matriz polimérica, sino que están accesibles sobre la superficie porosa para

interaccionar con los analitos de interés. En cualquier caso, para este fin, se hace indispensable que el monolito de partida posea una cierta reactividad, que facilite el anclaje de las NPs. En la gran mayoría de los casos, esto se consigue empleando como monómero de partida el glicidil metacrilato (GMA), que posee un grupo epóxido reactivo, susceptible de ser modificado químicamente una vez finalizado el proceso de polimerización. Así pues, una vez llevada a cabo la modificación del monolito base, el anclaje de las NPs viene respaldado por la propia afinidad que puedan tener las NPs frente a los grupos funcionales introducidos. Este es el caso de las NP de Au, que quedan inmovilizadas en la superficie del monolito de GMA en el que se ha introducido un grupo amino o un grupo tiol (véase Figura 3A) [8]. El material híbrido resultante puede utilizarse como sorbente para minicartuchos de SPE (Figura 3B). Así pues, nuestro grupo ha desarrollado estas fases híbridas conteniendo NPs de Au [17] o de Ag [18] para la extracción selectiva de lectinas y la preconcentración de viscotoxinas del muérdago, respectivamente, así como fungicidas [19], obteniéndose en todos los casos altas recuperaciones (>90%) y una excelente reutilización del material (en algunas muestras, hasta 120 veces).



**Figura 3.** A) Modificación de monolitos de GMA y post-funcionalización para inmovilizar NPs de Au. B) Fotografías del cartucho SPE y SEM del sorbente desarrollado. (De ref. 17).

También, hemos desarrollado materiales híbridos utilizando nanoestructuras de carbono [16] y NPs magnéticas [20, 21] en diversos formatos de SPE. En el caso de los soportes basados en NPs magnéticas, se introdujo un agente silanzante en los monolitos de GMA para facilitar el posterior anclaje de las NPs magnéticas. El material desarrollado se aplicó tanto en modo SPE convencional como en modo dispersivo empleando un imán (*Magnetic SPE*) (véase Figura 4), reduciendo el tiempo de tratamiento de muestra y minimizando el riesgo de contaminación o degradación de la muestra. Estos sorbentes se aplicaron satisfactoriamente a la preconcentración de pesticidas organofosforados en muestras medioambientales [20] así como a la extracción de fosfolípidos en muestras de leche materna [21]. En ambas aplicaciones, se obtuvieron LODs bajos (hasta  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$  en el caso de pesticidas), y una alta reutilización del sorbente (hasta 50 usos sin pérdidas significativas en la recuperación).



**Figura 4.** Fotografías del material polimérico modificado con NPs magnéticas usado en SPE magnética y su caracterización por SEM. (De ref. 21).

#### 4. Nuevas aproximaciones de integración de fases monolíticas poliméricas

Además de su aplicación al ámbito HPLC-capilar/nano o CEC y SPE, el grupo han desarrollado recientemente monolitos poliméricos en nuevos soportes (en particular, en tubos de teflón) de diámetro interno superior a  $500 \mu\text{m}$  [22, 23]. La modificación química de la superficie de teflón con una mezcla  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  o el *photografting* sobre tubos de etileno fluorooetileno (ETFE) u otros fluoropolímeros ha permitido la inmovilización de grupos vinilo sobre la superficie de éstos, facilitando el anclaje posterior de monolitos. Dichas fases estacionarias monolíticas se han aplicado a la separación de moléculas pequeñas y proteínas. Así pues, este formato junto con los nuevos soportes basados en estos materiales, abren sin duda interesantes posibilidades al área de aplicación de estas fases poliméricas (sistemas en flujo, preconcentración en línea, etc) y su ventajosa funcionalización con nanomateriales.

#### Agradecimientos

Se agradece la financiación recibida de la Generalitat Valenciana (ref. proyecto PROMETEO PROMETEO/2016/145).

#### Referencias

- [1] F. Svec, Monolithic columns: A historical overview, *Electrophoresis* 38 (2017) 2810-2820.
- [2] F. Svec, T.B. Tennikova y Z. Deyl (eds.), *Monolithic Materials, Journal of Chromatography Library*, vol. 67, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- [3] A. Cantó-Mirapeix, J.M. Herrero-Martínez, C. Mongay-Fernández, E.F. Simó-Alfonso, Chemical initiation for butyl and lauryl acrylate monolithic columns for CEC, *Electrophoresis* 30 (2009) 599-606.
- [4] V. Bernabé-Zafón, A. Cantó-Mirapeix, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J.M. Herrero-Martínez, Comparison of thermal- and photo-polymerization of lauryl methacrylate monolithic columns for CEC, *Electrophoresis* 30 (2009) 1929-1936.

- [5] J. Huang, S.R. Turner, Hypercrosslinked polymers: A review, *Polym. Rev.* 58 (2018) 1–41.
- [6] Z. Zajickova, Advances in the development and applications of organic-silica hybrid monoliths, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 1–24.
- [7] F. Svec, Y. Lv, Advances and recent trends in the field of monolithic columns for chromatography, *Anal. Chem.* 87 (2015) 250-273
- [8] Y. Lv, F.M. Alejandro, J.M.J. Fréchet, F. Svec, Preparation of porous polymer monoliths featuring enhanced surface coverage with gold nanoparticles, *J. Chromatogr. A* 1261 (2012) 121–128.
- [9] E.J. Carrasco-Correa, F. Vela-Soria, O. Ballesteros, G. Ramis-Ramos, J.M. Herrero-Martínez, Sensitive determination of parabens in human urine and serum using methacrylate monoliths and reversed-phase capillary liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1379 (2015) 65-73.
- [10] M. Navarro-Pascual-Ahuir, R. Lucena, S. Cárdenas, G. Ramis-Ramos, M. Valcárcel, J.M. Herrero-Martínez, UV-polymerized butyl methacrylate monoliths with embedded carboxylic single-walled carbon nanotubes for CEC applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 6329-6336.
- [11] M. Navarro-Pascual-Ahuir, M.J. Lerma-García, G. Ramis-Ramos, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, Preparation and evaluation of lauryl methacrylate monoliths with embedded silver nanoparticles for capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 34 (2013) 925-934.
- [12] E.J. Carrasco-Correa; G. Ramis-Ramos; J.M. Herrero-Martínez, Hybrid methacrylate monolithic columns containing magnetic nanoparticles for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1386 (2015) 77-84.
- [13] A. Weller, E.J. Carrasco-Correa, C. Belenguer-Sapiña, A. R. Mauri-Aucejo, P. Amorós, J.M. Herrero-Martínez, Organo-silica hybrid capillary monolithic column with mesoporous silica nanoparticles for separation of small aromatic molecules, *Microchim. Acta* 184 (2017) 3799-3808.
- [14] E.J. Carrasco-Correa, A. Martínez-Vilata, J.M. Herrero-Martínez, J.B. Parra, F. Maya, V. Cerdà, C. Palomino-Cabello, G. Turnes-Palomino, F. Svec, Incorporation of zeolitic imidazolate framework (ZIF-8)-derived nanoporous carbons in methacrylate polymeric monoliths for capillary electrochromatography, *Talanta* 164 (2017) 348-354.
- [15] T. Nema, E.C. Chan, P.C. Ho, Applications of monolithic materials for sample preparation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 130-141.
- [16] B. Fresco-Cala, O. Mompó-Roselló, E.F. Simó-Alfonso, S. Cárdenas, J.M. Herrero-Martínez, Carbon nanotube-modified monolithic polymethacrylate pipette tips for (micro)solid-phase extraction of antidepressants from urine samples, *Microchim. Acta* 185 (2018) 127.
- [17] M. Vergara-Barberán, M.J. Lerma-García, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, Solid-phase extraction based on ground methacrylate monolith modified with gold nanoparticles for isolation of proteins, *Anal. Chim. Acta* 917 (2016) 37-43.
- [18] M. Vergara-Barberán, M.J. Lerma-García, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, Polymeric sorbents modified with gold and silver nanoparticles for solid-phase extraction of proteins followed by MALDI-TOF analysis, *Microchim. Acta* 184 (2017) 1683-1690.
- [19] M. Catalá-Icardo, C. Gómez-Benito, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, Determination of azoxystrobin and chlorothalonil using a methacrylate-based polymer modified with gold nanoparticles as solid-phase extraction sorbent, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 243-250.
- [20] S. Meseguer-Lloret, S. Torres-Cartas, M. Catalá-Icardo, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, Extraction and preconcentration of organophosphorus pesticides in water by using a polymethacrylate-based sorbent modified with magnetic nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 3561-3571
- [21] I. Ten-Doménech, H. Martínez-Pérez-Cejuela, E.F. Simó-Alfonso, S. Torres-Cartas, S. Meseguer-Lloret, J.M. Herrero-Martínez, Polymer-based materials modified with magnetite nanoparticles for enrichment of phospholipids, *Talanta* 180 (2018) 162-167.
- [22] M. Catalá-Icardo, S. Torres-Cartas, S. Meseguer-Lloret, C. Gómez-Benito, E.J. Carrasco-Correa, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J.M. Herrero-Martínez, Preparation of organic monolithic columns in polytetrafluoroethylene tubes for reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 960 (2017) 160-167.
- [23] M. Catalá-Icardo, S. Torres-Cartas, S. Meseguer-Lloret, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, Photografted fluoropolymers as novel chromatographic supports for polymeric monolithic stationary phases, *Talanta* 187, 216-222.