



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

Tendencias en el desarrollo de membranas artificiales inmovilizadas en cromatografía líquida y desarrollo de nuevas fases para el estudio de la biodisponibilidad de contaminantes ambientales

Juan Francisco Rodríguez Fernández

Grado de Química

Facultad de Química

Año Académico 2019-2020

Tendencias en el desarrollo de membranas artificiales inmovilizadas en cromatografía líquida y desarrollo de nuevas fases para el estudio de la biodisponibilidad de contaminantes ambientales

Juan Francisco Rodríguez Fernández

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Química

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2019-2020

Palabras clave del trabajo:

Plataformas fluídicas, biomimética, impresión 3D, cromatografía de líquidos de membrana artificial inmovilizada

Trabajo tutelado por Enrique Javier Carrasco-Correa

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Índice

1.Introducción.....	1
1.1. Biodisponibilidad de compuestos en el organismo humano	1
1.2. Métodos <i>in vitro</i> para la evaluación de la absorción de compuestos en organismos humanos	4
1.3. Tendencias en el estudio de absorción de compuestos en los organismos humanos mediante técnicas <i>in vitro</i> dinámicas.	5
1.3.1. Cromatografía de líquidos de membrana artificial inmovilizada	5
1.3.2. Cromatografía de líquidos biomimética.....	7
1.3.3. Cromatografía de líquidos de biopartición micelar	11
1.3.4. Otros métodos	13
1.3.5. Conclusiones de tendencias en el desarrollo de membranas artificiales inmovilizadas para técnicas de separación.....	16
1.4. Impresión 3D	16
1.5. Polímeros orgánicos porosos	17
2.Objetivo.....	18
3.Materiales y métodos	19
3.1. Reactivos, materiales y disoluciones	19
3.2. Instrumentación.....	19
3.3. Desarrollo de plataformas fluídicas mediante impresión 3D.....	20
3.4. Modificación de la pared interna de las plataformas fluídicas	21
3.5. Preparación in situ de polímeros orgánicos en las plataformas fluídicas modificadas	21
3.6. Modificación de la superficie del monolito orgánico con BSA	22
4.Resultados y discusión	22
4.1. Preparación y caracterización morfológica de las columnas preparadas	22
4.1.1. Diseño, impresión y modificación de las plataformas milifluídicas	22
4.1.2. Modificación de la superficie del monolito orgánico con BSA	24
4.2. Evaluación cromatográfica de las columnas preparadas	24
5.Conclusión y perspectivas futuras.....	26
6.Bibliografía.....	27

1.Introducción

1.1. Biodisponibilidad de compuestos en el organismo humano

La biodisponibilidad es un parámetro farmacocinético que nos indica la cantidad de un fármaco o contaminante que ha entrado al organismo mediante vía oral u otro medio y que ha llegado al sistema sanguíneo desde el sistema gastrointestinal (en el caso de la vía oral) a través de la membrana celular [1]. Por ejemplo, es importante que los fármacos presenten altas biodisponibilidades para evitar su metabolización antes de alcanzar la concentración a la que produce el efecto adecuado [2]. Sin embargo, la biodisponibilidad de contaminantes o compuestos nocivos debe ir en la dirección contraria y presentar un valor bajo para que sean metabolizados rápidamente y no alcancen la concentración que pueda producir un daño irreparable en los seres vivos. La biodisponibilidad depende principalmente de la solubilidad del compuesto y el tiempo de permanencia en el lugar de absorción, así como de la estabilidad química, ya que algunas reacciones químicas en el tracto gastrointestinal reducen la absorción (formación de complejos o hidrólisis) [2].

Por lo tanto, es importante establecer la biodisponibilidad y estudiar las interacciones que tienen lugar entre el compuesto en cuestión y la membrana plasmática. Es más, los fármacos o compuestos contaminantes poseen una serie de efectos sobre el organismo. Sin embargo, si se producen cambios en las estructuras de los compuestos, se producirán distintas interacciones que provocarán cambios en las propiedades farmacológicas y fisicoquímicas, y por tanto, en su biodisponibilidad [2]. Dentro de las propiedades farmacológicas cabe destacar la farmacocinética y la farmacodinámica [3]. Por otro lado, las propiedades fisicoquímicas incluyen, en este caso, la lipofilia (evaluada como $\log P_{o/w}$), el grado de ionización a pH fisiológico y el tamaño tridimensional de la molécula en cuestión que puede reducir la absorción debido a posibles impedimentos estéricos [4].

La membrana plasmática, es una estructura cubierta que delimita y protege a la célula del medio exterior, se encuentra compuesta por lípidos (fosfolípidos, colesterol, glucolípidos), una gran variedad de proteínas (integrales y periféricas) y carbohidratos [5]. La bicapa también tiene otros tipos de funciones como medir las interacciones de las células, modular la transducción de señales y realiza la transducción de energía. Además, es clave en la biodisponibilidad de los compuestos debido a que la membrana plasmática se encarga de regular el intercambio de sustancias entre el interior y el exterior de la célula, comportándose como una membrana permeable selectiva [5].

A lo largo de los años, se han propuestos varios modelos que explican cómo es la estructura de la membrana plasmática, y más importante, cómo es posible que funcione. En este sentido, el modelo más aceptado es el mosaico fluido, propuesto por Singer y Nicolson. Este modelo propone que la membrana plasmática se encuentra formada por una bicapa lipídica, de unos 4 nm, que constituye la estructura básica de la membrana que además, presenta proteínas intercaladas (proteínas integrales) y otras moléculas (ej. colesterol) descritas anteriormente (**Fig. 1**) [5,6].

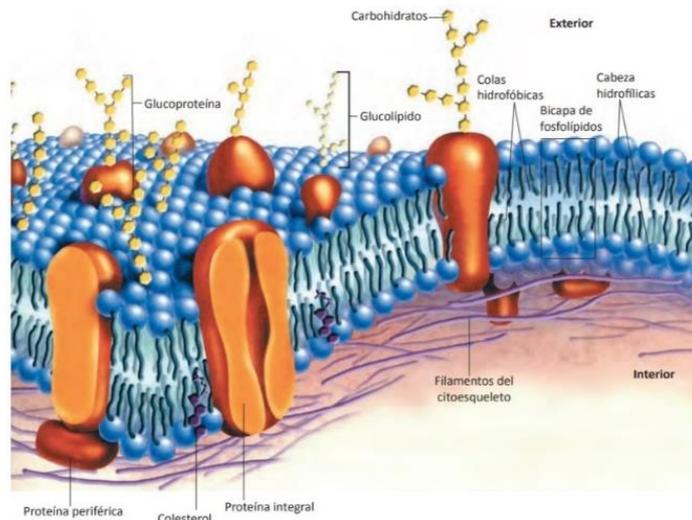


Fig. 1. Membrana plasmática [5]

Los fosfolípidos forman una bicapa lipídica en la que se llevan a cabo todos los intercambios de energía y de materia con el exterior de la célula [7]. En la membrana también se encuentra el colesterol que influye en la fluidez y permeabilidad de la membrana. Concentraciones elevadas de colesterol producen una membrana más rígida, y por tanto, menos permeable. Además, este aumento también incrementa la hidrofobicidad de la bicapa, afectando a los procesos de intercambio que se producen en la membrana plasmática [8,9].

Por otro lado, las proteínas presentes en la bicapa lipídica poseen varias funciones entre las que se encuentran la participación en el transporte de moléculas al interior de la célula, actuar como receptores para la activación enzimática o reconocimiento celular, además de otras funciones importantes en el organismo. Las proteínas pueden ser intrínsecas, las cuales se encuentran incrustadas en el interior de la membrana y solo pueden ser eliminadas al desnaturalizarse [5] o periféricas, que son proteínas extrínsecas, es decir, se encuentran unidas mediante enlaces no covalentes a los ácidos grasos de la bicapa o mediante interacciones electrostáticas con las proteínas integrales que se encuentran sobre la superficie de la membrana [10].

Por último, los carbohidratos se encuentran presentes en su mayor parte sobre la superficie de la bicapa lipídica y poseen varias funciones entre las que destacan el proceso de reconocimiento celular, la carga negativa que aportan los hidroxilos a la superficie de la célula, aumentando su viscosidad, además de otras funciones.

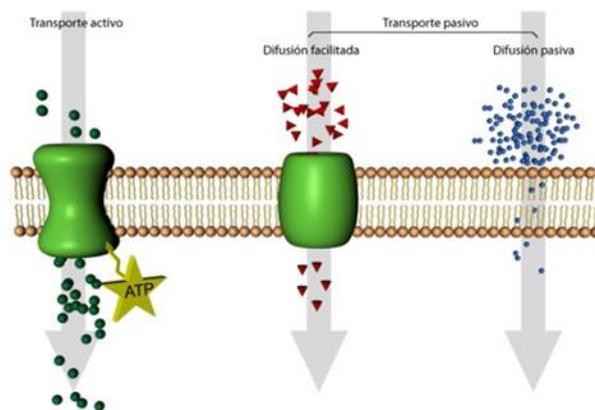


Fig. 2. Diferentes tipos de transportes a través de la membrana plasmática

La biodisponibilidad de un compuesto tiene lugar mediante la migración de sustancias a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Esto puede suceder a través de la bicapa lipídica mediante difusión simple o transportes pasivo o activo (**Fig. 2**). La difusión simple se basa en que las sustancias exógenas circulan a favor del gradiente debido a la diferencia de concentración entre las moléculas que se encuentran en el citoplasma y las que se encuentran en el medio exterior. El flujo de moléculas (J) a través de la membrana lipídica viene determinada por la ley de Fick.

$$J=D \frac{A(c_1-c_2)}{d} \quad \text{Ec. 1}$$

donde D es el coeficiente de difusión, A es el área de superficie de la membrana, c_1 es la concentración del compuesto en el exterior, c_2 en el citoplasma, y d es el grosor de la membrana, que en este caso se corresponderá con el grosor de la membrana plasmática. Como puede observarse, la ley de Fick es directamente proporcional al coeficiente de difusión, a la área de superficie de la membrana y al gradiente de concentraciones e inversamente proporcional al grosor de la membrana. Por su parte, el coeficiente de difusión depende del peso molecular, del grado de ionización y de la liposolubilidad. Esto quiere decir que las moléculas más pequeñas, liposolubles y con menor carga eléctrica presentarían mayor coeficiente de difusión. Por lo tanto, la capacidad de un compuesto para atravesar la membrana plasmática depende tanto de las propiedades fisicoquímicas como de las características de la membrana [10].

Además de la difusión a través de la bicapa lipídica, el transporte de moléculas al interior de la membrana también se lleva a cabo a través de las proteínas. Esto es importante ya que gran parte de las moléculas esenciales para la célula son moléculas polares y por tanto su difusión a través de la bicapa lipídica es demasiado lenta (o incluso nula). Por lo tanto, la presencia de ciertas proteínas integradas embebidas en la bicapa lipídica genera canales perfectos para este tipo de sustancias, así como otras moléculas exógenas con carácter polar [10].

El transporte a través de las proteínas puede ser pasivo o activo (**Fig. 2**). El transporte pasivo consiste en que las sustancias circulan a favor de un gradiente de concentración a través de proteínas transportadoras, como la permeasa, o por proteínas canal. Dentro del transporte pasivo, existen dos tipos principales, la difusión facilitada que se produce a través de las proteínas canal, las cuales poseen un centro de unión que interacciona con el compuesto provocando la apertura del canal. Por otro lado, la difusión facilitada que se produce a través de las proteínas transportadoras o permeasas, las cuales, al interaccionar con la sustancia produce un cambio conformacional que arrastra la sustancia que ha producido la activación [10].

Por otro lado, en el transporte activo, las sustancias circulan en contra del gradiente de concentración. Para ello, se produce una reacción química que permite el transporte de la sustancia a través de las proteínas de membrana. Este tipo de reacción consume energía, es decir, consume adenosín trifosfato (ATP). Los procesos de transporte activo más conocidos son la bomba de Na^+/K^+ y la bomba de Ca^{2+} [10].

El estudio de la biodisponibilidad se puede realizar mediante dos métodos, el método *in vivo* o el método *in vitro*. En el caso de los métodos *in vivo*, se administran dosis de la sustancia que se pretende estudiar a animales modelo como ratones, ratas, monos o perros, que posteriormente son sacrificados [11]. Cabe señalar que hay varios tipos de métodos *in vivo* como es el caso de la medición de la concentración en el líquido cefalorraquídeo (CSF) o la concentración bioacumulada en tejidos, el uso de microdiálisis para medir la

penetración cerebral, la determinación del log *BB* (*logarithm of the brain versus blood ratio*) y la medición de la PSP (*permeability-surface area product*) [12].

1.2. Métodos *in vitro* para la evaluación de la absorción de compuestos en organismos humanos

En contraposición a los métodos *in vivo* se encuentran las metodologías *in vitro*, que son aquellos métodos que se llevan a cabo sin la necesidad de un organismo animal o humano vivo. Sin embargo, son capaces de simular unas condiciones fisiológicas reales y controladas (pH, temperatura, concentración...) [13]. Además, los métodos *in vitro* presentan una serie de ventajas ya que permiten la realización de un mayor número de test por unidad de tiempo, son más fáciles de cuantificar, más económicos, no necesitan experiencia quirúrgica [14] y pueden presentar menores errores que al extrapolar resultados de otras especies animales a humanos [12].

Sin embargo, los métodos *in vitro* no presentan los mismos parámetros que los metros *in vivo* y es necesario realizar comparaciones para la validación de los resultados. Uno de los parámetros *in vivo* más empleados es la partición hematoencefálica (log *BB*, Ec. 2) para fármacos que hace referencia a la proporción de analito distribuido en el cerebro y en la sangre, un mayor log *BB* implica una mayor absorción/penetración cerebral [15].

$$\text{Log } BB = \log \frac{C_{Brain}}{C_{Blood}} \quad \text{Ec. 2}$$

donde C_{Brain} es la concentración en equilibrio del analito en el cerebro expresada en molaridad (M) y C_{Blood} es la concentración en equilibrio en la sangre expresada en M. Otros parámetros *in vivo* que también se usan en farmacología son el logaritmo del porcentaje de absorción en el intestino, AUC (*Area Under Curve*), HIA (*Human Intestinal Absorption*) o PSP (*permeability-surface area product*), aunque son menos empleados [16–18].

En cambio, los parámetros *in vitro* que se suelen usar para comparar con el log *BB* son habitualmente el factor de retención cromatográfico (log *k*), el coeficiente de partición octanol/agua (log $P_{o/w}$) o el coeficiente de distribución para moléculas ionizadas (log *D*) [19,20]. El log *k* (Ec. 3) hace referencia al tiempo que un compuesto es retenido (tiempo de retención, t_R) en un sistema cromatográfico pero corregido por el tiempo muerto (t_M) [21]:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}; \log k = \log \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) \quad \text{Ec. 3}$$

El log $P_{o/w}$ consiste en calcular el cociente entre las concentraciones de un analito que se encuentran en dos fases inmiscibles tras un proceso de equilibrio. En concreto, se suele usar como referencia el sistema compuesto por octanol y agua. Y se define de la siguiente manera [20]:

$$\text{Log } P_{o/w} = \log \frac{C_{octanol}}{C_{agua}} \quad \text{Ec. 4}$$

donde $C_{octanol}$ y C_{agua} son las concentraciones en equilibrio en octanol y en agua, respectivamente, expresadas en M.

Por último, el log *D* hace referencia al coeficiente de distribución para moléculas ionizadas y se expresa de la siguiente manera:

$$\text{Log } D = \text{Log } P_{o/w} + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}}} \right] \text{ (medio ácido)} \quad \text{Ec. 5}$$

$$\text{Log } D = \text{Log } P_{o/w} + \log \left[\frac{1}{1 + 10^{\text{pKa} - \text{pH}}} \right] \text{ (medio básico)} \quad \text{Ec. 6}$$

Este tipo de coeficiente se usa cuando no se puede aplicar el $\log P_{o/w}$, como es en el caso de compuestos ionizados y que se ven afectados por el cambio de pH en el tracto gastrointestinal; ácido en el estómago y neutro/básico en el intestino delgado.

Como es de esperar, estos parámetros *in vitro* pueden obtenerse a través de diferentes metodologías que pueden dividirse en dos grandes grupos: métodos estáticos y métodos dinámicos. Uno de los métodos estáticos más utilizados es el ensayo paralelo de permeabilidad de membrana artificial (*parallel artificial membrane permeability assay*, PAMPA) [12]. Otras técnicas empleadas son las que usan líneas celulares como la MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) o las líneas celulares intestinales Caco-2 entre otras [22]. Estas técnicas consisten en medir el coeficiente de partición líquido-líquido entre dos líquidos separados por una membrana biológica o sintética y se miden las cantidades de analito que ha sido capaz de atravesarla y las que no. Otro tipo de sistemas como las celdas de Franz, que funcionan en sistemas estáticos permiten el empleo de pieles reales para los estudios de biodisponibilidad de compuestos, aunque suelen usarse más en absorción cutánea.

Por otro lado, se encuentran los métodos dinámicos, como la cromatografía de líquidos de membrana artificial inmovilizada (*immobilized artificial membrane chromatography*, IAMC), la cromatografía de líquidos biomimética (*biomimetic liquid chromatography*, BLC) o la cromatografía de líquidos de biopartición micelar (*biopartitioning micellar chromatography*, BMC) [12]. En general, los métodos dinámicos tienen muchas más ventajas que los métodos estáticos ya que necesitan una menor cantidad de analito para medir la retención, una pequeña cantidad de impurezas no afectan al resultado ya que estas se separan durante el proceso cromatográfico, las mediciones se pueden automatizar [13,23], son menos costosas y tienen mayor rendimiento y reproducibilidad [14]. Explicaciones más detalladas de estas técnicas, así como de otras que puedan emplearse para evaluar la biodisponibilidad de fármacos y/o contaminantes se comentarán en los siguientes apartados.

1.3. Tendencias en el estudio de absorción de compuestos en los organismos humanos mediante técnicas *in vitro* dinámicas.

1.3.1. Cromatografía de líquidos de membrana artificial inmovilizada

La necesidad de estudiar la capacidad de absorción de nuevos fármacos y contaminantes en los últimos años ha llevado a la comunidad científica a desarrollar métodos *in vitro* que puedan predecirla. En este sentido, la aparición de nuevos materiales ha permitido el uso de la cromatografía para estudiar la biodisponibilidad de los compuestos [24]. En concreto, un tipo de cromatografía muy interesante consiste en desarrollar materiales que simulan la membrana plasmática de las células. Con este propósito, se inmovilizan liposomas y/o fosfolípidos basados en fosfatidilcolina (*phosphatidylcholine*, PC) en partículas de sílice u otras fases sólidas. Este tipo de cromatografía se conoce como cromatografía de líquidos de membrana artificial inmovilizada o IAMC por sus siglas en inglés [21].

La IAMC es una técnica que combina las ventajas del HPLC (rapidez, eficacia y reproducibilidad) con el uso de fases estacionarias que simulan el entorno lipídico de la membrana plasmática (**Fig. 3**). Este tipo de fase sólida permiten predecir la absorción en el organismo mediante difusión pasiva. Este proceso se basa básicamente en la retención de los compuestos debido a las interacciones lipofílicas e hidrofílicas de éstos con la fase estacionaria. Por lo tanto, el factor de retención de los compuestos es una estimación de la biodisponibilidad de los compuestos [21]. Sin embargo, todavía es necesario sintetizar nuevos materiales que permitan obtener mejores correlaciones que las obtenidas hasta la fecha entre los datos obtenidos en IAMC y los obtenidos de las metodologías *in vivo* convencionales.

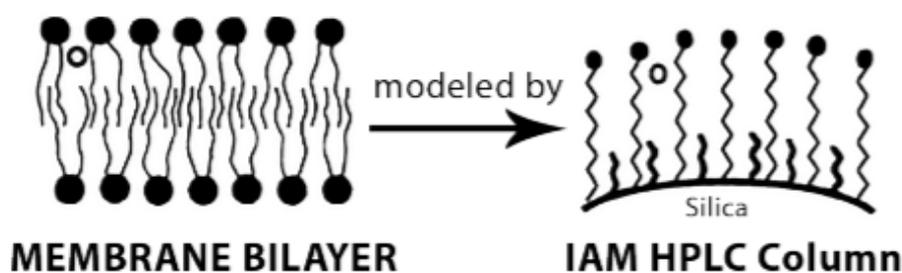


Fig. 3. Representación esquemática de una bicapa lipídica y de una fase estacionaria IAM [21].

La primera columna para IAMC fue diseñada en 1989 por Pidgeon y Venkataram [25] mediante la inmovilización de lecitina, compuesta mayoritariamente por PC, a través de un enlace covalente por la cadena alquílica modificada a unas partículas esféricas de sílice que contenían grupos propilamino (IAM-PC). Esta columna se utilizó para la separación de péptidos y proteínas ácidas (tripsina, albumina y ovoalbúmina) y para explicar las interacciones que pueden producirse en la membrana plasmática. Desde entonces, se han publicado muchos trabajos en los que intentan relacionar datos de biodisponibilidad *in vivo* con las retenciones en este tipo de columnas. En la Tabla 1, se encuentran resumidos los trabajos de IAMC que han sido publicados en el periodo 2015-2020. Como puede observarse, predomina el uso de las columnas comerciales, como la IAM.PC.DD2 [26] o IAM-PC.MG [26–28]. Estas columnas se basan en cadenas de PC unidas por la parte alquílica a partículas de sílice que posteriormente se empaquetan en una columna de acero entre dos fritas metálicas. Básicamente, su uso en los últimos años se ha centrado en comparar parámetros *in vitro* como el $\text{Log } D$ [26] o simulaciones con software especializado [27] con el $\text{Log } k$ obtenido de estas columnas. Por otro lado, algunos investigadores han optado por sintetizar nuevas fases estacionarias para su aplicación en IAMC. Por ejemplo, las columnas desarrolladas por Wang y col. [28] se basaron en el uso de PC modificada con grupos vinilo, ya que permiten su uso como un monómero funcional y que posteriormente se copolimerizará con un entrecruzador para formar una columna monolítica preparada *in situ* en un capilar de sílice fundida. Sin embargo, solo comparan datos fisicoquímicos entre las distintas columnas preparadas y la comercial IAM.PC.DD2. Otro trabajo interesante es el desarrollado por Moravcovà y col. [29] donde se prepara una columna monolítica basada en glicidil metacrilato y etilenglicol dimetacrilato que después de la polimerización *in situ* en un capilar de sílice fundida es modificada a través de varias reacciones con PC, aunque se ancló mediante el grupo fosfato, pudiéndose formar una bicapa dinámica que simula mejor la membrana plasmática. En este caso, los $\text{Log } k$ obtenidos con esta columna modificada con PC se compararon con los Log del porcentaje de absorción de un intestino (HIA) de rata

invertido. Los resultados muestran buenas correlaciones ($R^2 = 0.7345$) para una serie de 12 compuestos de distintas familias.

Sin embargo, pese a los interesantes trabajos publicados, aún queda mucho margen en el desarrollo de fases estacionarias que imiten con mayor exactitud la membrana plasmática y por tanto proporcionen mejores predicciones de la biodisponibilidad de los compuestos. Como se ha visto, el uso de polímeros porosos monolíticos modificados son una interesante alternativa para desarrollar estos sistemas IAM en el futuro. Además, su combinación con nuevas tecnologías y nuevos materiales pueden ofrecer nuevas combinaciones que permitan mejorar las correlaciones entre biodisponibilidad y los parámetros fisicoquímicos que pueden obtenerse mediante estas técnicas *in vitro*.

1.3.2. Cromatografía de líquidos biomimética

Un tipo de cromatografía interesante que puede utilizarse para estudiar la biodisponibilidad es la cromatografía de líquidos biomimética o BLC. Esta modalidad se basa en el uso de fases estacionarias que intentan simular las interacciones que se producen entre los compuestos y los integrantes de la membrana plasmática como son proteínas y glicoproteínas, colesterol u otros fosfolípidos menos habituales. Por ejemplo, se usan las fases estacionarias de tipo C18, para simular las interacciones de los compuestos con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos presentes en la membrana plasmática [13].

Por otro lado, las columnas formadas por proteínas estudian las interacciones polares entre los compuestos y las proteínas localizadas en la membrana plasmática u otras proteínas importantes en el proceso de interacción con la membrana plasmática [13]. En el caso de este tipo de columnas la cantidad de compuestos que van a interactuar depende de dos factores que son la hidrofobicidad y la acidez o basicidad del compuesto. Por consiguiente, cuanto más polar sea un compuesto más fuerte serán las interacciones con las proteínas presentes en la fase estacionaria y por tanto, mayor será su tiempo de retención [30]. Dentro de las columnas formadas por proteínas caben destacar dos tipos que son las columnas formadas por albúmina de suero humano (*human serum albumin*, HSA), que es una proteína que se encuentra en el suero sanguíneo y por alfa-1-ácido-glicoproteína (*alpha-1-acid-glycoprotein*, AGP), que se encuentra embebida en la membrana plasmática. En el caso de las columnas formadas por HSA, interacciones fuertes con los compuestos denotarán mayor tendencia a entrar en el suero sanguíneo, en vez de permanecer en la membrana plasmática en el caso de una absorción gastrointestinal.

Tabla 1. Información (bio)analítica más relevante sobre los artículos de IAMC publicados en los últimos 5 años.

Columna	Modificador	Funcionalización	Soporte	Analitos (n°)	Fase móvil y detección	Comparación de parámetros	Ref
IAM.PC.DD2 (e,c)	PC	En la superficie a través de la cadena alquílica	Columna comercial	Analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (60)	Diferentes mezclas de ACN/H ₂ O/PBS UV (210-254 nm)	Log <i>D</i> vs Log <i>k</i>	[26]
IAM PC.MG (e,c)							
Poli(GMA- <i>co</i> -EDMA) (i,s)	PC	En la superficie a través del grupo fosfato	Capilar de sílice fundida	Ácidos orgánicos, lidocaína y sulfanilamida (12)	5/95% (v/v) MeOH/PBS UV (210-220 nm)	Log %AI vs Log <i>k</i>	[29]
IAM.PC.DD2 (e,c)	PC	En la superficie a través de la cadena alquílica	Columna comercial	Antipsicóticos, antidepresivos, anticolinérgico, otros fármacos y contaminantes (70)	PBS/ACN UV (207, 220, 254 and 278 nm)	Cosmonic simulations vs Log <i>k</i>	[27]
IAM.PC.DD2 (e,c)	PC	En la superficie a través de la cadena alquílica	Columna comercial	Analgésico, antiinflamatorio, antipirético, otros fármacos y contaminantes (80)	Acetato de amonio/ACN UV (214-254 nm)	Comparación entre columnas con los valores de los índices hidrofóbicos cromatográficos	[28]
Poli(MDSPC- <i>co</i> -EDMA) (i,s)	MDSPC	Copolimerización	Capilar de sílice fundida				
Poli(MDPC- <i>co</i> -EDMA) (i,s)	MDPC	Copolimerización	Capilar de sílice fundida				

* (c): comercial; (s): sintetizada; (m): comercial modificada; (e): empaquetada; (i): preparada *in situ*

Abreviaturas: PC: fosfatidilcolina (*phosphatidylcholine*); MDSPC: 1-dodecanoil-2-(11-metacrilamidoundecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina (*1-dodecanoyl-2-(11-methacrylamidoundecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine*); MDPC: 12-metacrilil dodecilsfosfocolina (*12-methacryoyl dodecylphosphocholine*); ACN: acetonitrilo; PBS: tampón salino de fosfato (*phosphate buffer saline*); AI: absorción intestinal.

A diferencia del caso anterior, si se utiliza una columna formada por AGP, si los compuestos a analizar presentan interacciones fuertes con la fase estacionaria, estos poseerán una mayor facilidad para atravesar la membrana plasmática [30]. En este sentido, un trabajo interesante es el desarrollado por Lasic [31] ya que obtiene el valor de $\log k$ de diferentes compuestos utilizando dos columnas, la Chiralpak-HSA y la Chiralpak-AGP. En este caso, se observó que los compuestos que presentaban interacciones fuertes con las columnas de HSA presentaban menor interacción con las columnas de AGP y viceversa. Esto demuestra que ambas columnas se comportan de forma complementaria. Por ejemplo, en el caso del compuesto Biochanin A, su valor de $\log k$ obtenido mediante la columna AGP es de 0,432, mientras que con la columna de HSA es de 1,458. Esto demostraría que el Biochanin A tendría menos tendencia a atravesar la membrana plasmática a través de las proteínas embebidas. Estos valores concuerdan con los bajos valores de bioaccesibilidad de esta molécula en estudios sobre ratas [32].

A parte de los tipos de fases estacionarias mencionados, existen otro tipo de fases estacionarias que simulan las interacciones entre los compuestos y otros componentes de la membrana plasmática como en el trabajo desarrollado por Mike de Vrieze [33]. En este trabajo se sintetizó una columna de esfingomielina, que es un fosfolípido menos habitual que se encuentra rodeando las vainas de mielina de los axones de las células nerviosas. La síntesis se realizó mediante el anclaje a las partículas de sílice a través de la cadena alquílica modificada con un carboxilo. Además, los resultados obtenidos se compararon con las columnas comerciales IAM.PC.DD2 (basada en PC) y la Cosmosil cholester (basada en colesterol). En este caso, los resultados obtenidos experimentalmente ($\log k$) de la columna IAM.PC.DD2 se usaron para predecir los valores de $\text{Log } BB$ obtenidos *in vivo* mediante el uso de dos modelos diferentes: regresión por mínimos cuadrados parciales (*partial least squares*, PLS) o por validación cruzada (*leave-one-out cross-validation*, LOOCV). El modelo para el $\text{Log } BB$ obtenido mediante PLS proporcionó mejores resultados ($R^2 = 0,8772$) que el modelo LOOCV ($R^2 = 0,6231$). En relación a las otras dos columnas, tanto la sintetizada de esfingomielina como la del colesterol comercial mostraron buenas correlaciones con el modelo *in-vivo* ($R^2 = 0.8701$ y 0.8604 , respectivamente). Estos resultados son bastantes similares ya que todas presentan estructuras basadas en lípidos. Además, es lógico esperar que las correlaciones obtenidas con la columna de colesterol sean algo más bajas, probablemente debido a su carácter menos polar al no disponer del grupo fosfato característico en los fosfolípidos como la PC y la esfingomielina. Además, la presencia de colesterol en la membrana es menor que el de los fosfolípidos, de ahí también que pueda presentar menos correlación.

Tabla 2. Información (bio)analítica más relevante sobre los artículos de cromatografía biomimética publicados en los últimos 5 años.

Columna	Modificador	Funcionalización	Soporte	Analitos (nº)	Fase móvil y detección	Comparación de parámetros	Ref
Cosmosil cholester (e,c)	Colesterol	En la superficie a través de la cadena alquílica	Columna comercial	Anestésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (49)	70/30 PBS/MeOH	Log <i>BB</i> experimental vs Log <i>BB</i> predicho	[33]
Sphingomyelin column (e,s)	Esfingomielina		Columna sintetizada		50/50 PBS/MeOH UV (210-270 nm)		
Amino-P-C18 (e,s)	N,O-dialquilfosforamidato	En la superficie a través de la cadena alquílica	Columna comercial	Bases nucleicas, flavonoides, nucleósidos, PAHs , otros fármacos y contaminantes (27)	50/50 H2O/MeOH 100% H ₂ O UV (180 – 800 nm)	Log <i>P</i> vs Log <i>k</i>	[34]
			Columna sintetizada				
Chiralpak-HSA (e,c)	HSA	En la superficie a través de la cadena alquílica	Columna comercial	Anestésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (35)	Acetato NH ₄ OH/ACN/ IPA UV (210-300 nm)	<i>CHI</i> vs Log <i>P</i>	[31]
		En la superficie a través de la cadena alquílica					
Chiralpak-AGP (e,c)	AGP	En la superficie a través de la cadena alquílica					
Kinetex EVO C18 (e,c)	Cadena alquílica	En la superficie a través de la cadena alquílica	Columna comercial	Anestésicos, analgésicos, androgénicos, esteroides, otros fármacos y contaminantes (65)	40/60 ACN/PB UVUV (200 nm)	Log <i>k</i> experimental vs Log <i>k</i> predicho	[35]

* (c): comercial; (s): sintetizada; (m): comercial modificada; (e): empaquetada; (i): preparada *in situ*

Abreviaturas: AGP: alfa-1-ácido-glicoproteína (*alpha-1-acid-glycoprotein*); HSA: albúmina de suero humano (*human serum albumin*); IPA: isopropanol; ACN: acetonitrilo; PBS: tampón salino de fosfato (*phosphate buffer saline*); CHI: índice de hidrofobicidad cromatográfica (*chromatographic hydrophobicity index*).

1.3.3. Cromatografía de líquidos de biopartición micelar

La cromatografía de líquidos de biopartición micelar o BMC fue desarrollada en 1998 por Escuder-Gilbert [36]. En este tipo de cromatografía se usa un surfactante en la fase móvil por encima de su concentración micelar crítica. En este caso, las micelas, al viajar más lentas que la fase móvil actúan como fases pseudoestacionarias emulando una bicapa lipídica capaz de imitar las interacciones entre los compuestos y la membrana plasmática [37]. En este tipo de cromatografía, la retención de los compuestos se debe a las interacciones de los compuestos con la fase estacionaria y también con las micelas presentes en la fase móvil. Por tanto, mayores interacciones significarán mayores tiempos de retención ya que las micelas viajan a menor velocidad que la fase móvil. Estas interacciones dependen principalmente de las propiedades hidrofóbicas, estéricas y electrónicas de los compuestos (**Fig. 4**) [38].

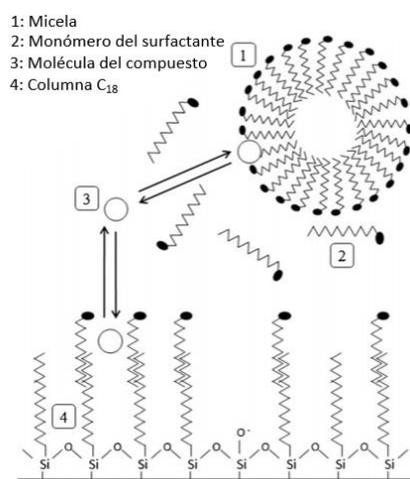


Fig. 4. Representación de las interacciones de los compuestos en la BMC [38].

En un principio, se pensó en usar los fosfolípidos como surfactantes, sin embargo, el problema que surgió era que tienen un coste elevado y muy poca solubilidad en agua. Por ello, en la actualidad se intentan buscar alternativas de surfactantes económicos y que tengan la capacidad de emular las interacciones de la membrana plasmática. En este sentido, los surfactantes utilizados en BMC pueden ser de diferentes tipos, ya que pueden ser neutros, catiónicos o aniónicos [37]. A lo largo de estos últimos años, se han utilizado varios tipos de surfactantes como es el caso del desoxicolato de sodio (surfactante aniónico) que es una sal biliar presente en el tracto gastrointestinal [39] o surfactantes de la familia Brij (surfactantes neutros) [40], así como la miltefosina (surfactante neutro) [18]. Estos surfactantes suelen emplearse en columnas cromatográficas particuladas que contienen grupos C₁₈ [18,40] o grupos aminopropil o cianopropil [41]. Un resumen de los trabajos publicados en BMC en los dos últimos años puede encontrarse en la Tabla 3.

De entre todos los surfactantes, cabe destacar la miltefosina ya que posee una composición similar a la de la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Además, puede sintetizarse de forma masiva y barata. En concreto, un trabajo interesante es el desarrollado por Vrieze y col. [18] donde combina una fase móvil que contiene

Tabla 3. Información (bio)analítica relevante sobre los artículos de BMC publicados en los últimos 5 años.

Columna	Surfactante	Soporte	Analitos (n°)	Fase móvil y detección	Comparación de parámetros	Ref
Grace GraceSmart C ₁₈ (e,c)	Miltefosina	Columna comercial	Analgésico, estimulantes, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (48)	0,01M miltefosina/PBS UV (210-300 nm)	Log <i>BB/HIA</i> experimental vs Log <i>BB/HIA</i> predicha	[18]
Columna de cianopropil (e,c)	NaDC	Columna comercial	Anestésicos, antihipertensivo, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (16)	NaDC/PBS UV (221–285 nm)	<i>P_{mw}</i> vs % <i>HIA</i>	[41]
Zorbax Extend-C18 (e,c)	Brij35	Columna comercial	Anestésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (13)	Mezcla de la fase acuosa (40 mM de soluto de Brij35 en 7 mM hidrogeno fosfato disódico) y ACN (80:20, v/v) UV (210 nm)	<i>k</i> bibliográfica vs <i>k</i> experimental	[40]
Fase reversa aminopropil (APS) (e,c)	NaDC	Columna comercial	Antimicóticos, antiinflamatorios, estimulantes, otros fármacos y contaminantes (23)	NaDC / H ₂ O (5-20 mM) UV (180 – 800 nm)	<i>HIA</i> experimental Vs <i>HIA</i> predicha	[42]

* (c): comercial; (e): empaquetada

Abreviaturas: NaDC: desoxicolato de sodio (*Sodium deoxycholate*); PBS: tampón salino de fosfato (*phosphate buffer saline*); Brij35: polioxietileno lauril éter (*polyoxyethylene lauryl ether*); HIA: absorción intestinal humana (*human intestinal absorption*).

miltefosina, ajustada a pH fisiológico, con una columna C18. En este caso, los resultados obtenidos experimentalmente ($\log k$) se usaron para predecir los valores de $\log BB$ y HIA obtenidos *in vivo* mediante el uso de dos modelos diferentes: PLS y LOOCV. El modelo para el $\log BB$ obtenido mediante PLS proporcionó mejores resultados ($R^2 = 0,8827$) que el modelo LOOCV ($R^2 = 0.5298$). Las mismas tendencias se encontraron al intentar predecir el HIA, donde el modelo basado en PLS presentó mejores correlaciones ($R^2 = 0.8237$) que el modelo basado en LOOCV ($R^2 = 0.3666$). Los resultados obtenidos utilizando la miltefosina como surfactante en BMC demuestran que es una buena alternativa para predecir valores como el $\log BB$ o el HIA *in vivo*.

1.3.4. Otros métodos

Otros tipos de técnicas que se utilizan habitualmente para emular las condiciones tanto fisiológicas como estructurales de la membrana plasmática son la cromatografía de fluidos supercríticos (*supercritical fluid chromatography*, SFC), la electrocromatografía capilar (*capillary electrochromatography*, CEC), la cromatografía electrocinética micelar de biopartición (*biopartitioning micellar electrokinetic chromatography*, BMECK), la cromatografía líquida de microemulsión (*microemulsion liquid chromatography*, MELC) y la cromatografía de capa fina (*Thin layer chromatography*, TLC).

La cromatografía de fluidos supercríticos utiliza fases estacionarias quirales que pueden emular las interacciones que se producen entre la membrana plasmática y compuestos polares [43]. Por su parte, la electrocromatografía capilar es una técnica cromatográfica que utiliza como fase estacionaria un capilar de sílice que contiene una fase sólida (particulada o monolítica) recubierta con un fosfolípido u otro componente de la membrana plasmática, el cual interacciona con los compuestos (**Fig. 5A**). De esta forma se emulan las interacciones que se producen en la membrana plasmática como puede pasar en IAMC y BLC, pero con una técnica de separación basada en la migración de los compuestos en presencia de un campo eléctrico [14]. Otra técnica que puede emplearse es la cromatografía electrocinética micelar de biopartición o BMECK, que combina la cromatografía con la electroforesis capilar, pero con el uso de surfactantes con una concentración superior a la concentración micelar crítica como pseudofase estacionaria. Esta fase se usa para imitar la membrana plasmática [44,45] y se emplean los surfactantes utilizados en BMC como el SDS [46] o el Brij35 (**Fig. 5B**) [47]. Por otro lado, la cromatografía líquida de microemulsión o MELC se basa en la utilización de una microemulsión como fase móvil formada por una fase oleosa, una fase acuosa, un surfactante y también puede estar presente un cosurfactante. El proceso se basa principalmente en que el tensioactivo se coloca en la interfase entre el agua y el aceite con las cadenas hidrofóbicas orientadas hacia el aceite y los grupos hidrofílicos orientados hacia el agua emulando así, la membrana plasmática (**Fig. 5C**) [48]. Por último, encontramos la cromatografía de capa fina o TLC que se basa en la utilización de una fase estacionaria apolar (gel de sílice, óxido de aluminio neutro o placas de celulosa) y una fase móvil polar (que contiene sales inorgánicas) para determinar la lipofilia del analito, ya que es el factor principal que determina la difusión pasiva a través de la membrana plasmática (**Fig. 5D**) [49].

En la Tabla 4 se presentan las características de estas otras técnicas que se utilizan para determinar la penetración de compuestos a través de la membrana plasmática. Un trabajo

que cabe destacar es el desarrollado por Godyn y col. [14]. En ese trabajo se emplea CEC mediante el empleo de capilares de sílice fundida modificados con liposomas basados en fosfocolina y fosfoserina, simultáneamente, como análogos de la membrana biológica. Los resultados experimentales ($\log k$) se compararon con los del $\log BB$ obtenidos de datos bibliográficos obtenidos de métodos *in vivo*. Los resultados obtenidos con estas columnas mostraron una correlación bastante baja con un valor de $R^2 = 0,4258$. Además, los autores emplearon lípidos polares extraídos de cerebro de cerdo para preparar otras columnas para CEC aunque con peores resultados que las columnas basadas en fosfocolina y fosfoserina. En ambos casos, los autores asocian la baja correlación a las diferencias entre los métodos *in vivo* e *in vitro*, aunque los resultados se asemejan bastante a los que se obtiene mediante la metodología de PAMPA cuando intentan simular las interacciones que expliquen el cociente de $\log BB$.

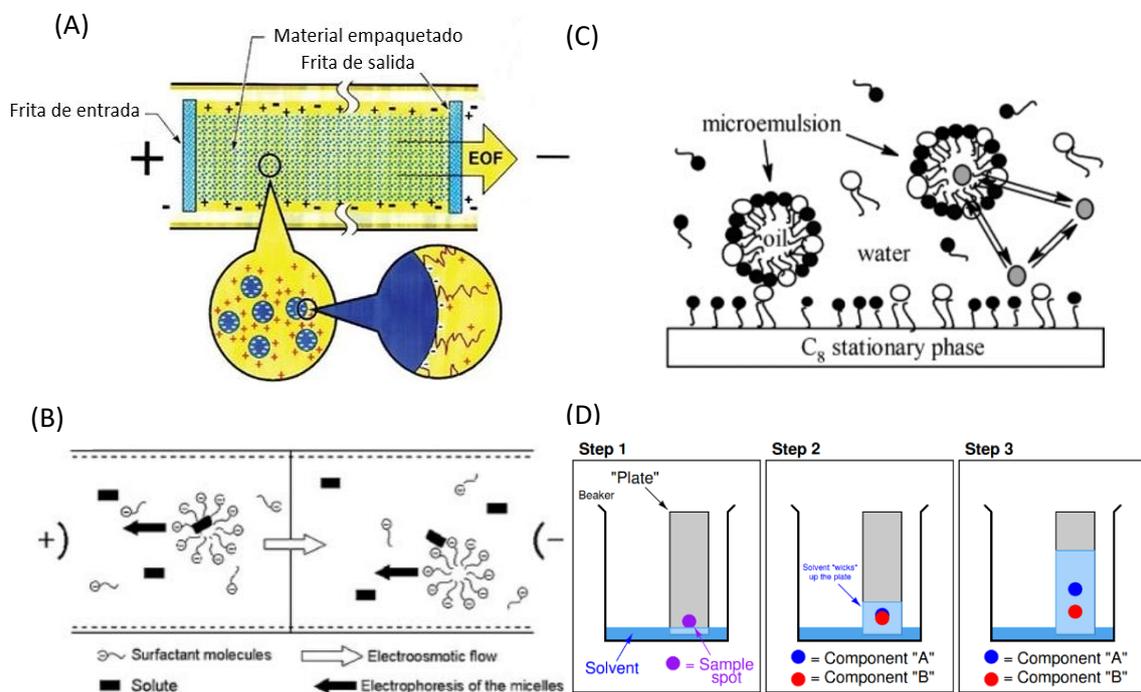


Fig. 5 – (A) Electro cromatografía capilar. (B) Cromatografía electrocinética micelar de biopartición. (C) Cromatografía líquida de microemulsión. (D) Cromatografía de capa fina [20,45].

Tabla 4. Información (bio)analítica relevante sobre los artículos de técnicas empleadas en el estudio de la biodisponibilidad publicados en los últimos 5 años.

Columna	Modificador	Técnica	Soporte	Analitos (n°)	Fase móvil y detección	Comparación de parámetros	Ref
Chirex 3014 (e,c)	(S)-valine / (R)-1-(alfa-naftil)etilamina	SFC	Columna comercial	Anestésicos, antiinflamatorio, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (69)	CO ₂ /MeOH UV (210-300 nm)	Valores de EPSA vs Log BB	[43]
POPC/PS capilar de sílice fundido (i,s)	POPC/PS liposomas	CEC	Capilar de sílice fundido	Anestésicos, antiinflamatorio, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (25)	HEPES 40 mM UV (220 nm)	Log <i>k</i> vs Log BB	[14]
PBL capilar de sílice fundido(i,s)	PBL						
No se indica	Brij35	BMEKC	Capilar de sílice fundido	Antimetabolito, vasodilatador, antipsicótico, otros fármacos y contaminantes (36)	PBS/ Brij35 UV-visible (620nm)	Log <i>K</i> vs Log BB	[47]
Odyssil C18 (e,c)	-	MELC	Columna comercial	Anestésicos, antiinflamatorio, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (48)	6.0% Brij-35 / 6.6% butanol / 0.8%, n-octanol/86.6% PBS UV (180 – 800 nm)	Log <i>k</i> Vs Log <i>P</i>	[48]
No hay columna	WF _{254s}	TLC	Gel de sílice	Anestésicos, antiinflamatorio, antipiréticos, otros fármacos y contaminantes (26)	(NH ₄) ₂ SO ₄ /H ₂ O UV (254-366 nm)	Compara 3 modelos de regresión	[49]
No hay columna	-	TLC	Placa de celulosa				
No hay columna	F _{254s}	TLC	Óxido de aluminio neutro				

* (c): comercial; (s): sintetizada; (m): comercial modificada; (e): empaquetada; (i): preparada *in situ*

Abreviaturas: POPC: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine); PS: fosfatidilinositol (*phosphatidylinositol*); PBL: lípidos cerebrales polares (*polar brain lipid*) Brij35: polioxi-etilén lauril éter (*polyoxyethylene lauryl ether*); ACN: acetonitrilo; PBS: tampón salino de fosfato (*phosphate buffer saline*); HEPES: ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanosulfónico (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*); EPSA: área de superficie polar expuesta (*exposed polar surface area*); F_{254s}: indicador fluorescente azul (*blue fluorescent indicator*); W: totalmente humectable con agua (*fully wettable with water*).

1.3.5. Conclusiones de tendencias en el desarrollo de membranas artificiales inmovilizadas para técnicas de separación

Como se ha ido viendo a lo largo de las distintas tablas presentadas en este trabajo, que resumen los avances realizados en los últimos dos años, hay una carencia de importantes avances en el desarrollo de nuevos sistemas dinámicos basados en separación que emulen la membrana plasmática. La mayoría de los artículos se centran en el uso de columnas comerciales o sistemas que tienen correlaciones poco precisas y que no explican de manera correcta la facilidad que tienen los compuestos para ser absorbidos a través de la membrana plasmática. En este sentido, algunos autores han intentado presentar nuevos materiales que imiten con mayor precisión los tipos de interacciones que se producen entre los compuestos analizados y los distintos componentes de la membrana plasmática, pero con resultados que aún deben ser mejorados.

Las técnicas separativas para estudiar las interacciones entre la membrana plasmática y compuestos como fármacos o contaminantes son muy variadas. Sin embargo, como es de esperar en técnicas separativas, la cromatografía de líquidos abarca la mayor parte de las publicaciones, ya sea como IAMC, BLC o BMC. Aunque otras técnicas separativas como BMEKC o CEC presentan una serie de ventajas interesantes como bajo consumo de disolventes y bajo coste que las convierten en alternativas idóneas a la cromatografía convencional. Por lo tanto, es de esperar que en los próximos años este tipo de técnicas ofrezca resultados interesantes en esta área de la separación de compuestos simulando procesos fisiológicos.

Sin embargo, es cierto que los mejores resultados se obtienen cuando se introducen fosfolípidos en los materiales que se usan para estudiar las separaciones. En este sentido, trabajos interesantes usando mezclas de fosfolípidos o fosfolípidos anclados de manera no convencional al soporte cromatográfico han demostrado mostrar resultados interesantes. Además, algunos autores, también han intentado explicar otros tipos de interacciones con el uso de sistemas separativos que contenían otras sustancias presentes en la membrana plasmática como el colesterol o α -glicoproteína. En este sentido, en el futuro, se debería estudiar la posibilidad de preparar sistemas separativos que presenten varios tipos de interacciones simultáneamente y que imiten de una manera más precisa todos los tipos de interacciones presentes en la membrana plasmática.

1.4. Impresión 3D

La impresión 3D es una técnica que surgió en los años 80, aunque no ha sido hasta hace relativamente poco que ha empezado a convertirse en una tecnología fácilmente accesible. Esta técnica se basa principalmente en la agregación de un material capa a capa hasta obtener el resultado final impreso a partir de un diseño por ordenador del objeto realizado mediante un software de modelado tipo CAD (*Computer Aided Design*) [50–52]. El uso de la impresión 3D posee varias ventajas, ya que permite la fabricación de dispositivos de forma rápida y con un bajo coste, facilitando la optimización del objeto impreso final mediante procesos iterativos de modificación del modelo digital. A parte, también admite la fabricación de dispositivos más complejos que no pueden prepararse de manera convencional o en caso de poderse, tendrían un coste muy elevado [50].

En impresión 3D no solamente existe un tipo de técnica, sino que en función de la forma de creación de las capas se obtienen distintos sistemas que ofrecen distintas ventajas y desventajas [50]. Entre las técnicas más habituales se pueden encontrar el modelaje por deposición fundida (*fused deposition model*, FDM), la estereolitografía (*stereolithography*, SLA), el procesamiento digital de luz (*digital light processing*, DLP), la inyección de tinta de fotopolímero (*photopolymer inkjet printing*, PIP) y la sinterización selectiva por láser (*selective laser sintering*, SLS) [50,53,54].

Las distintas tecnologías proporcionan distintas formas de imprimir las capas y también el uso de materiales variados. El FDM, por ejemplo, es una de las tecnologías más disponibles debido a su bajo coste y se basa en la deposición de un termoplástico fundido, el cual se extruye por presión y se va depositando sobre una plataforma que puede estar caliente o no [54]. Por su parte, una tecnología de impresión con un coste intermedio y que presenta muchas oportunidades es la SLA. Este método de impresión 3D se basa en enfocar un haz de luz (láser) sobre un tanque lleno de resina de fotopolímero, la cual va fotopolimerizando capa a capa hasta formar el dispositivo o instrumento deseado [52,54]. Una imagen de una impresora 3D de tipo SLA y un esquema detallado de todos los pasos que realiza para imprimir una pieza se encuentra en la **Fig. 6**.

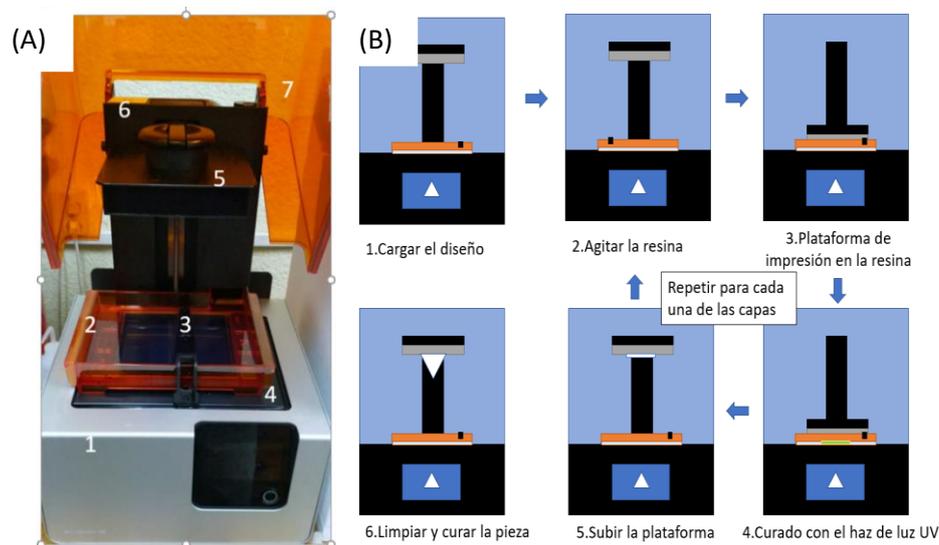


Fig. 6 – (A) Impresora tipo SLA. (B) Proceso de impresión de una impresora de tipo SLA. Los números indican: Módulo de control (1); tanque de resina (2); resina (3); plataforma del haz de luz (4); plataforma de impresión (5); cartucho de resina (6); cubierta protectora de luz UV (7).

Este tipo de impresora presenta una serie de ventajas para el desarrollo de sistemas milifluídicos, ya que al imprimir las distintas capas por fotopolimerización presenta un componente de estanqueidad que no se aprecia en las impresoras de tipo FDM. Sin embargo, después de la impresión, la pieza necesita un tiempo de curado para terminar de polimerizar y que pueda emplearse para el uso al que estaba destinada [51].

1.5. Polímeros orgánicos porosos

La impresión 3D es un sistema interesante, pero solo permite la impresión de soportes que después pueden usarse en sistemas milifluídicos o similares. Además, estos soportes presentan baja área superficial, y por tanto su capacidad para retener sustancias cuando se usan en técnicas como HPLC o similares es muy limitada. En este sentido, su combinación con polímeros orgánicos porosos (POP) es de gran interés. Estos polímeros presentan una serie de características que los hacen idóneos para usarlos como fases

estacionarias en HPLC: se pueden preparar *in situ*, son estables en un amplio rango de pH, su superficie es fácilmente modificable y presentan una estructura monolítica con macroporos que permite el flujo a través a caudales muy elevados con bajas contrapresiones.

Estos materiales se preparan a partir de una mezcla de polimerización que debe contener el monómero funcional (proporciona el grupo de interacción o para su posterior modificación) y un entrecruzador (que permite entrelazar las cadenas poliméricas para formar la estructura 3D) que suelen ser monómeros de (meta)acrilato o derivados del poliestireno. Además, contiene una mezcla de porógenos (actúan como solvatantes y en función de su contenido en la mezcla afectan la estructura morfológica del POP final) y un iniciador (permite el comienzo de la reacción radicalaria). Además, si la reacción de polimerización sucede dentro de un soporte que ha sido previamente modificado con grupos vinilo, el polímero quedará enlazado covalentemente a la superficie, evitando así la necesidad del empleo de fritas que contengan el material en la zona interna. Esta ventaja respecto a los materiales particulados ofrece una gran variedad a la hora de su preparación en soportes no convencionales como los que se pueden preparar en técnicas de impresión 3D y que se describirán en este TFG. En cuanto a la iniciación de la polimerización, esta puede realizarse por medios térmicos, mediante radiación ultravioleta o iniciación química (reacciones redox) entre otros. Una vez el polímero se ha formado en el soporte en cuestión y se han eliminado los porógenos y monómeros que no han reaccionado, el polímero muestra una estructura macroporosa de tipo coliflor que permite ser empleada en técnicas de separación [51].

En el caso de que el monómero funcional empleado sea, por ejemplo, el glicidil metacrilato (GMA) sería posible su posterior funcionalización mediante reacciones de apertura del epóxido tras la reacción con reactivos que contengan grupos nucleofílicos. En este sentido, se han publicado muchos trabajos que muestran la versatilidad de estos materiales a la hora de preparar nuevos sistemas separativos que ofrezcan multitud de posibilidades de interacción compuesto-fase estacionaria [29,55]. En este sentido, el uso de POPs para imitar las interacciones presentes en la membrana plasmática ha sido propuesto en una ocasión [29] y ha sido descrito en este trabajo en el apartado 1.3.1. Por lo tanto, el uso de estos materiales es una buena alternativa para preparar sistemas biomiméticos y la capacidad de ser combinados con estructuras impresas en 3D puede ofrecer un avance interesante en este campo de investigación (bio)analítico.

2. Objetivo

En este trabajo se pretenden fabricar plataformas fluídicas impresas en 3D mediante estereolitografía (SLA) que contengan fases estacionarias basadas en POPs modificadas con proteínas y/o liposomas. Estas columnas se emplearán para establecer la biodisponibilidad de distintos compuestos mediante IMAC y las retenciones establecidas se comparan con resultados *in vivo* extraídos de la bibliografía.

En consecuencia se establecen los siguientes subobjetivos:

- a) Desarrollo de plataformas milifluídicas en espiral construidas mediante impresión 3D basada en SLA.
- b) Modificación de la pared interna del canal del soporte 3D con grupos vinilo que permitan el anclaje de fases estacionarias basadas en POPs y preparadas *in situ*.

c) Modificación de la superficie de los POPs con proteínas que se encuentran en el suero sanguíneo (BSA/HSA), proteínas presentes en la membrana plasmática (α -glicoproteína) y liposomas a través del grupo fosfato.

d) Aplicación de las columnas impresas con POPs modificados para el estudio de la biodisponibilidad e interacciones con la membrana plasmática de distintos contaminantes emergentes.

Sin embargo, debido a la situación de alarma ocasionada por el COVID-19, algunos de los objetivos no han podido ser alcanzados o estudiados en profundidad. Por lo tanto, se ha replanteado el trabajo para contener una extensa revisión bibliográfica de los últimos dos años, así como una parte que explique los subobjetivos experimentales que han podido ser parcialmente desarrollados.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos, materiales y disoluciones

En este trabajo, se utilizaron los siguientes reactivos: dimetacrilato de etilenglicol (*ethylene glycol dimethacrylate*, EDMA), metacrilato de glicidilo (*glycidyl methacrylate*, GMA), acetonitrilo (ACN), peróxido de dilaurilo (*dilauroyl peroxide*, LPO), albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA) que fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Vienna, Austria). Isopropanol (IPA), metanol (MeOH), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (*1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride*, EDC), 1,6-hexanodiamina (*1,6-hexanediamine*, HMD), N-hidroxisuccinimida (*N-hydroxysuccinimide*, NHS), cloruro de potasio (KCl), 1-dodecanol (DoD), ciclohexanol (*cyclohexanol*, CYC), hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), cloruro de sodio (NaCl), dihidrógenofosfato de sodio dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hidrógenofosfato de sodio (Na_2HPO_4) fueron adquiridos en Fisher Scientific (Barcelona, España) y agua desionizada. Para la impresión de los sistemas milifluídicos se empleó resina Clear V4 (FLGPCLO2, FormLabs). En cuanto a los contaminantes emergentes y clásicos que se utilizaron son los siguientes: bisfenol A (BPA), metilparabeno (MPB), butilparabeno (BPB), fenilparabeno (PhPB), triclosán (TCS) y una mezcla de PAHs que fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Vienna, Austria). Se prepararon disoluciones de patrones comerciales de los contaminantes emergentes (BPA, MPB, BPB, PhPB y TCS) y de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) (antraceno, pireno, fluoranteno y benzo(ghi)perileno) a concentraciones de $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ en MeOH. Estas disoluciones se almacenaron hasta su uso en nevera a 4°C . A partir de estas disoluciones se realizaron las diluciones pertinentes para su inyección en HPLC. La disolución de PBS consiste en una mezcla de tampón fosfato $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ con 137 mM NaCl y 2.7 mM KCl ajustada a pH 7.4.

3.2. Instrumentación

La balanza analítica (Cobos) se utilizó para pesar los reactivos y las disoluciones preparadas. La fabricación de las plataformas milifluídicas se realizó mediante una impresora 3D Form 2 (FormLabs, Somerville, MA, E.E.U.U.) con el software Freecad v.0.18 y una cámara UV con dos lámparas de mercurio de 5W (Psky). Las reacciones de

modificación de la pared, de polimerización y de modificación del POP se realizaron en una estufa (R2PY2). Se utilizó una bomba de HPLC de la marca Waters (Milford, MA, E.E.U.U.) para limpiar las columnas tras el proceso de polimerización o modificación.

Para el estudio de retenciones de los analitos de estudio se utilizó un HPLC Jasco equipado con una bomba cuaternaria de alta presión PU-4180, un autosampler AS-4050, un detector fluorescente FP-4025, un detector de tipo fila de diodos MD-4017, la interfaz LC-NETII/ACD y el software ChromNav 2.01.06.

3.3. Desarrollo de plataformas fluídicas mediante impresión 3D

El dispositivo milifluídico diseñado mediante el software FreeCad 0.18 (**Fig. 7**) se diseñó con la configuración del canal interno principal que puede verse en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros empleados para diseñar la plataforma fluídica impresa 3D

Número de vueltas	15
Diámetro interno del canal	2 mm
Espacio entre canales	2 mm
Longitud de la hélice	60 mm
Diámetro de la hélice	5.266 mm
Longitud total efectiva de la hélice	25 cm

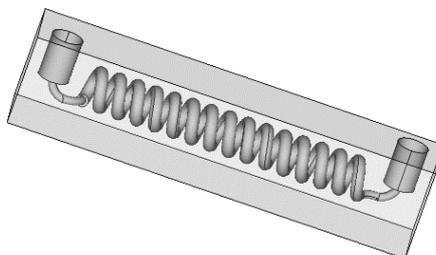


Fig. 7– Diseño 3D del sistema milifluídico

Los canales internos en forma de hélice se encuentran embebidos en un cubo de dimensiones 15×13×65 mm. Además, el sistema presenta los huecos para realizar la posterior mecanización de las conexiones y los enlaces que conectan la hélice con la entrada y la salida del flujo. Dichos huecos consistían en un cilindro de un diámetro de 5.5 mm y 8 mm de profundidad. El modelo 3D se cargó posteriormente en el software CAM (*computer aided manufacturing*) del fabricante (Preform, Formlabs) para la posterior impresión en la orientación adecuada.

Una vez impresas las plataformas milifluídicas, siguiendo el protocolo descrito por Carrasco-Correa y col.[51], las columnas se limpiaron con IPA y se dejaron curar durante 4 h en una cámara UV. Posteriormente, se realizó la mecanización de las conexiones para obtener una conexión hembra de tipo ¼ 28' para poder conectarlas posteriormente al cromatógrafo de líquidos.

3.4. Modificación de la pared interna de las plataformas fluídicas

Para llevar a cabo la funcionalización de las plataformas fluídicas se siguió el procedimiento descrito por Carrasco-Correa y col. [51] y el cual se muestra en la **Fig. 8**. En primer lugar, los canales internos se llenaron con una disolución 2 M de NaOH en agua, tras sellar el sistema. Las plataformas se colocaron en una estufa a 60 °C durante 4 h. Posteriormente se lavaron con HCl 0.1 M y agua y se secaron con una corriente de N₂. A continuación, a los canales modificados se les introdujo una disolución acuosa de EDC 0.2 M y NHS 0.3 M y tras sellarlos, se mantuvieron a 60 °C durante 30 min. Posteriormente, tras lavarlos con agua e IPA y secarlos con una corriente de N₂, los canales se rellenaron con una disolución acuosa de HMD 0.52 M y se dejaron reaccionar 1 h a 60 °C. Finalmente, tras limpiar y secar el canal, se introdujo una disolución 2 M de GMA en ACN para generar los grupos vinilos en la superficie interna del canal. Por último, después de 2 h a 60 °C, el canal interno del sistema milifluídico se limpió con ACN e IPA y se secó con una corriente de N₂. Las plataformas se almacenaron selladas para evitar la humedad hasta su uso para polimerizar *in situ* la fase sólida de tipo POP y generar así la columna cromatográfica monolítica.

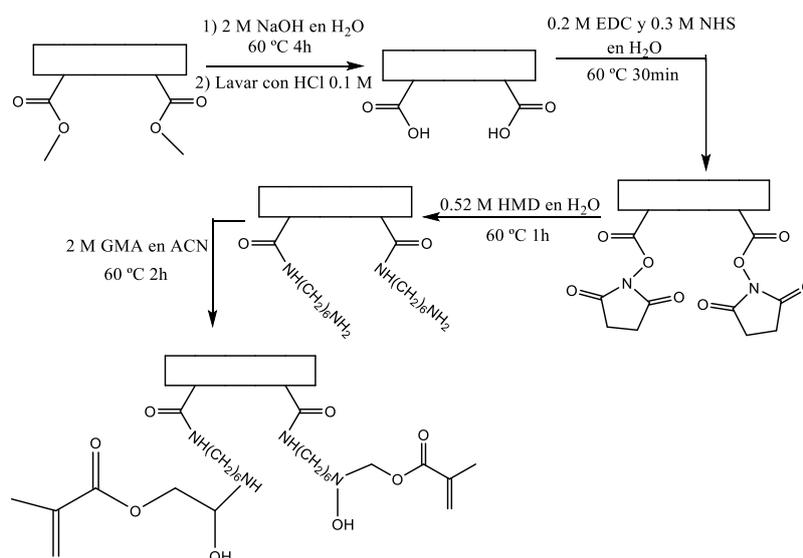


Fig. 8. Esquema de la modificación de la pared interna de las plataformas fluídicas impresas 3D

3.5. Preparación *in situ* de polímeros orgánicos en las plataformas fluídicas modificadas

Con el objetivo de preparar una fase sólida de tipo POP *in situ* que pudiese modificarse a posteriori, se preparó un monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) siguiendo el procedimiento descrito por Carrasco-Correa y col.[29]. Con este objetivo, se utilizó una mezcla compuesta por un monómero funcional, GMA (20% m/m), un entrecruzador, EDMA (5% m/m), una mezcla porogénica binaria (CYC, 70% m/m y DOD, 5% m/m) y como iniciador de la reacción de polimerización LPO (1% m/m). La mezcla pesada, se mantuvo durante 15 min en un baño de ultrasonidos frío para homogeneizarla antes de ser introducida en la columna impresa en 3D. Posteriormente, y tras sellar la columna evitando cualquier burbuja de aire, la columna es introducida en una estufa a 60 °C para dejar que ocurra la polimerización radicalaria térmica durante 14 h. Una vez finalizada la

polimerización, se limpiaron los monolitos dejando fluir una mezcla de agua/IPA, durante unos 20-25 minutos para eliminar los restos de porógenos y monómeros no copolimerizados. Una vez limpias, las columnas se encontraban listas para su uso en HPLC o para su posterior modificación.

3.6. Modificación de la superficie del monolito orgánico con BSA

La fase sólida poli(GMA-*co*-EDMA) preparada *in situ* en el interior de los canales de la plataforma milifluídica impresa en 3D se modificó, basándose en el artículo de Du y col. [56] con una solución acuosa de BSA de 50,000 mg L⁻¹. Con este objetivo, las columnas se llenaron con la disolución pertinente mediante el uso de una bomba de HPLC y se dejaron reaccionar selladas durante 8 h a temperatura ambiente (R.T.). Posteriormente, las columnas se lavaron con agua e IPA para limpiarlas y se dejaron listas para su uso en HPLC.

4. Resultados y discusión

4.1. Preparación y caracterización morfológica de las columnas preparadas

4.1.1. Diseño, impresión y modificación de las plataformas milifluídicas

Con el objetivo de diseñar una plataforma fluídica 3D impresa adecuada, se planteó el diseño de una plataforma en forma de espiral, ya que estas mantienen un flujo más homogéneo [57]. Además, de esta forma se pueden obtener columnas con una longitud efectiva mayor sin aumentar el consumo de material o el tiempo de impresión. El primer diseño propuesto consistió en una columna tipo hélice tridimensional (**Fig. 9A**). Sin embargo, pese a su bajo consumo de material, se rompían fácilmente cuando se conectaban al equipo de HPLC, ya que el monolito que se encontraba en la zona interior generaba contrapresiones elevadas. Como alternativa, se diseñó una columna en espiral cumpliendo las mismas medidas y condiciones que la anterior, pero con un revestimiento macizo a fin de proporcionarle una mayor resistencia a la contrapresión que se genera al fluir un líquido a través del sistema interno conteniendo un polímero (**Fig. 9B**). Las columnas del tipo de la **Fig. 9B** conteniendo el POP anclado demostraron no presentar problemas al conectarlas a un equipo HPLC por lo que se usaron en los siguientes experimentos.

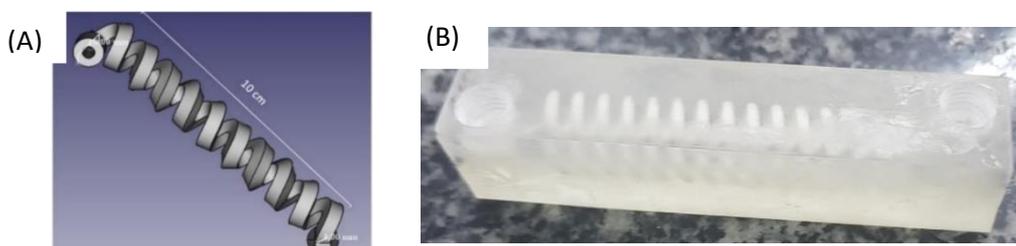


Fig. 9 – (A) Diseño CAD de columna en espiral. (B) Diseño de columna en forma de muelle con revestimiento macizo.

Con el objetivo de conseguir anclar un POP en el canal interno del sistema milifluídico impreso en ausencia de fritas se optó por realizar una modificación química de las paredes de los canales impresos. Mediante una serie de reacciones (**Fig. 8**) se pretendían generar grupos vinilos en la superficie del canal para que al realizar la polimerización, el POP generado quedase anclado covalentemente al canal al copolimerizar con esos grupos. Con

el objetivo de comprobar que las reacciones hayan tenido lugar, cada paso de la reacción se analizó mediante ATR-FTIR. En primer lugar se obtuvo el espectro IR de la pieza impresa sin modificar (**Fig. 10A**), donde se observan las bandas características del acrilato polimerizado. En concreto, se observan las bandas correspondientes a los enlaces C-O (1052 y 1141 cm^{-1}), enlaces C=O (1240 y 1701 cm^{-1}), deformaciones simétricas y asimétricas de los grupos CH_2 y CH_3 (2800 - 3000 cm^{-1}) y los enlaces O-H (3370 cm^{-1}) que provienen del IPA residual que se usa para limpiar las piezas tras la impresión. A continuación, se lleva a cabo la hidrólisis básica del éster a un grupo carboxilato mediante la reacción con NaOH. En el espectro IR (**Fig. 10B**), se observó que la banda a 1701 cm^{-1} de la **Fig. 10A**, se desdobra en dos bandas casi solapadas a 1702 y 1694 cm^{-1} pertenecientes al enlace C=O de los grupos éster y carboxilato, respectivamente. También, podemos observar el crecimiento de las bandas correspondientes a los enlaces O-H entre 3300 y 3400 cm^{-1} , debido a la hidrólisis del éster y posterior lavado con HCl. Continuando con el proceso de modificación, se usó una mezcla de EDC y NHS, seguido de HMD para generar grupos amino en la superficie interna del canal. Como puede observarse en el espectro IR (**Fig. 10C**), la banda correspondiente al C=O se vuelve a dividir en diferentes bandas debido a los distintos grupos carbonilos que se encuentran tras la formación de la amida (1666 y 1722 cm^{-1}) y grupos residuales ácidos (1694 cm^{-1}) y ésteres (1703 cm^{-1}). Además, se pueden observar tres bandas correspondientes a la amina primaria y la amida en 950 , 1548 y 3372 cm^{-1} y las bandas de 950 y 1548 cm^{-1} que se corresponden al enlace N-H tanto de la amina primaria como de la amida. Por último, se realiza una reacción con GMA, mediante apertura del epóxido, para generar los grupos vinilo. En la **Fig. 10D** se pueden observar menos desdoblamiento de bandas en la zona los enlaces C=O, esto puede ser debido al incremento de los grupos éster y los grupos vinilo (1640 - 1680 cm^{-1}) de la molécula de GMA, ya que al ensancharse la banda se reduciría la resolución. Sin embargo, se observa una reducción de la banda de N-H (3372 , 950 y 1548 cm^{-1}) y un aumento de la banda de C-N (1028 cm^{-1}), debido a la conversión de la amina primaria en aminas secundarias o terciarias. En este sentido parece que cada amina primaria, reacciona con dos grupos de GMA formando una amina terciaria que a su vez contiene 2 grupos vinilos. Estos datos demuestran la consecución del objetivo de generar grupos vinilo en la superficie del canal interno.

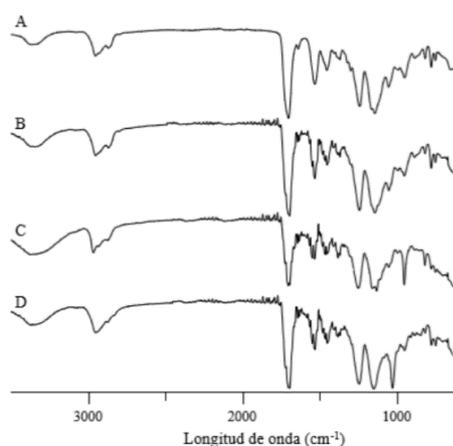


Fig. 10. Espectro de ATR-FTIR de los distintos pasos de la reacción seguidos para la modificación de la pared interna de la columna impresa en 3D. (A) Espectro correspondiente a la columna sin tratamiento. (B) bandas obtenidas tras el tratamiento con NaOH y posterior acidificación. (C) espectro que se obtiene después de la reacción EDC, NHS y HMD. (D) Bandas obtenidas tras la modificación final con GMA.

A continuación, se realizó la polimerización de la mezcla de monómeros descrita en el apartado 3.5, generando la columna monolítica. Esta mezcla de polimerización, que contiene GMA como monómero, permite la posterior modificación de la columna una vez polimerizada para anclarle a su superficie los grupos deseados mediante reacción con GMA (indicado en el siguiente apartado). Con el fin de confirmar que el procedimiento descrito produce el anclaje covalente a la superficie interna de la plataforma fluidica impresa se hicieron fluir mezclas de agua-IPA a distintos caudales (hasta 1 mL min^{-1}) y no se observó deterioro en las columnas realizadas. Además, se comprobó mediante el microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscope*, SEM) que los polímeros formados tenían la estructura característica globular con macroporos (**Fig. 11A**) y que el polímero se encontraba pegado a la pared sin huecos apreciables (**Fig. 11B**), lo que demuestra un buen anclaje a la pared interna del soporte impreso en 3D.

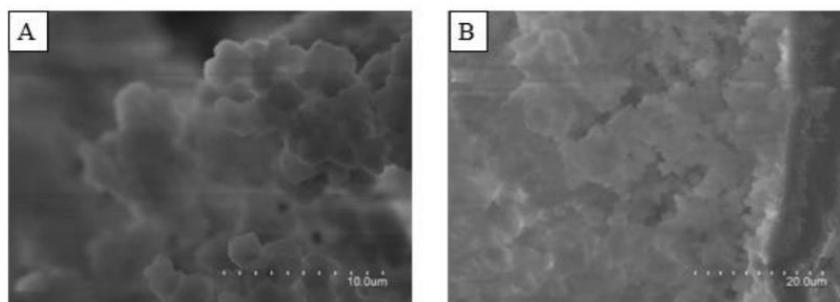


Fig. 11. Micrografías obtenidas del interior de las plataformas fluidicas mediante SEM

4.1.2. Modificación de la superficie del monolito orgánico con BSA

Uno de los objetivos de este trabajo era la síntesis de columnas monolíticas modificadas con BSA o HSA en soportes impresos en 3D para su posterior uso como columnas para BLC. En ese sentido, se aprovechó la multitud de grupos NH_2 presentes en el BSA [58] para realizar una apertura del epóxido que se encontraba disponible en las columnas de POP con GMA superficial descritas en el apartado anterior. Para realizar la reacción, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.6, lo que permitió obtener columnas que presentaban en su superficie moléculas de BSA (GMA@BSA) que podrían interaccionar con los analitos de interés.

4.2. Evaluación cromatográfica de las columnas preparadas

Con el objetivo de evaluar las columnas diseñadas (GMA y GMA@BSA) en un sistema cromatográfico con distintos analitos, se decidió estudiar las retenciones observadas para PAHs (antraceno, pireno, fluoranteno y benzo(ghi)perileno) y algunos contaminantes emergentes (BPA, MPB, BPB, PhPB y TCS) para estudiar su comportamiento en presencia de BSA. En la **Fig. 12** se muestran los cromatogramas obtenidos para ambos conjuntos de analitos y como puede verse, las eficacias de las columnas preparadas son bajas, es decir la anchura de los picos es elevada. Esta baja eficacia puede deberse a que las fases sólidas preparadas necesitan optimizarse con mayor precisión con el objetivo de maximizar su área superficial, que está intrínsecamente relacionada con la eficacia de las separaciones. Aun así, estas columnas sirven como una primera aproximación para el estudio de las interacciones que pueden darse con proteínas como la BSA. Para ello, se inyectó la mezcla de PAHs en ambas columnas (**Fig. 12A**) y como puede observarse, la columna GMA@BSA no consigue resolver la mezcla de PAHs. Sin embargo, en el caso

de la columna GMA se pueden observar una incipiente separación de estos. Esto se debe a que el GMA posee cadenas hidrocarbonadas capaces de producir interacciones de tipo van der Waals con los PAHs. En cambio, las columnas GMA@BSA al estar recubiertas por una molécula bastante polar como es el BSA, predominan otro tipo de interacciones que no pueden darse con los PAHs y por tanto se observa menor retención. En el caso de **Fig. 12B** se muestra la separación de una mezcla de los contaminantes emergentes utilizando una columna de GMA y otra de GMA@BSA. A diferencia del caso anterior, la columna modificada con BSA presenta una mejor separación de los analitos que el monolito de GMA. Esto puede ser debido a que los contaminantes emergentes de la mezcla son capaces de formar enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo dipolo con las moléculas ancladas de BSA. Por tanto, estas interacciones predominantes permiten la parcial separación de estos compuestos en la columna GMA@BSA. Esto no sucede de la misma manera en la columna de GMA, ya que los analitos prácticamente no interactúan con la fase estacionaria, por lo que todos ellos eluyen en el tiempo muerto.

Pese a la baja eficacia de estas columnas, se puede extraer que los PAHs al interactuar menos con el BSA tendrán mayor interacción con la parte hidrofóbica de la membrana plasmática que la mayoría de los otros compuestos, los contaminantes emergentes. No obstante, se deberían mejorar las eficacias de estas columnas y hacer estudios con fases sólidas modificadas con otras moléculas, tipo AGP, fosfolípidos, liposomas o colesterol para ver todos los tipos de interacción que se encuentran presentes en la membrana plasmática y así poder hacer predicciones más precisas que las ofrecidas por esta columna.

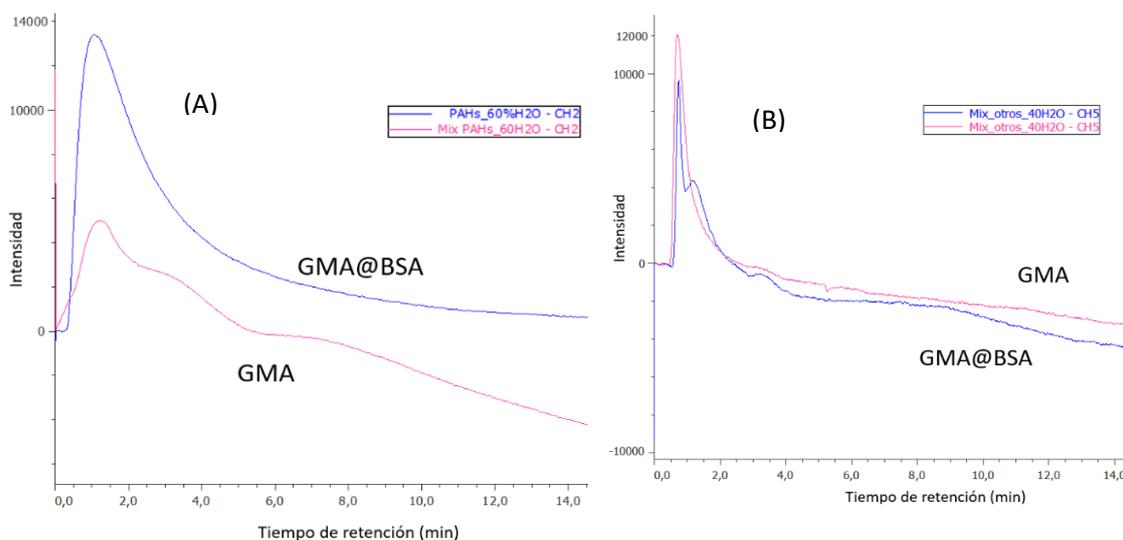


Fig. 12 – (A) Cromatogramas de PAHs en el monolito de GMA y en el monolito de GMA@BSA. Detección por fluorescencia: $\lambda_{\text{excitación}}$: 270nm y $\lambda_{\text{emisión}}$: 400nm (B) Cromatogramas de la mezcla de los otros compuestos en el monolito de GMA y en el monolito de GMA@BSA. Detección por UV a 214nm. Otras condiciones cromatográficas comunes: fase móvil: ACN-H₂O (60/40, v/v); volumen de inyección: 20 μ L; 0,5 mL min⁻¹

5. Conclusión y perspectivas futuras

En este trabajo se ha realizado una extensa revisión bibliográfica de todos los trabajos publicados en el período 2015-2020 relacionados con el desarrollo de sistemas separativos para la evaluación de la biodisponibilidad de compuestos orgánicos mediante técnicas dinámicas *in vitro*. En este sentido, se ha discutido la evolución de los sistemas cromatográficos en las distintas modalidades de separación y otras técnicas separativas (IAMC, BLC, BMC, SFC, CEC, BMECK, MELC, TLC). Una de las conclusiones más importantes que se puede extraer de este TFG, es que a lo largo de los años, el desarrollo de este tipo de fases estacionarias ha avanzado muy lentamente y es necesario que la comunidad científica mejore las fases sólidas disponibles para hacer columnas que predigan con mayor precisión los resultados que pueden obtenerse de otras metodologías *in vivo*.

Por otro lado, el planteamiento original del trabajo se basaba en el desarrollo de columnas monolíticas conteniendo biomoléculas que imitan las interacciones de la membrana plasmática en sistemas milifluídicos impresos en 3D. Sin embargo, esto ha podido ensayarse solo, a modo de prueba de concepto, con columnas que han sido modificadas con BSA. En primer lugar, se ha comprobado que el diseño de hélice para el sistema milifluídico era el más adecuado y se ha comprobado mediante el uso de ATR-FTIR, que la modificación de la superficie interna de la plataforma impresa con grupos vinilos funciona. Además, mediante SEM se ha comprobado el correcto anclaje del POP a la pared interna modificada con grupo vinilo del soporte impreso en 3D. Los resultados cromatográficos de dos grupos distintos de analitos muestran que compuestos menos polares como los PAHs, tienen poca interacción con el BSA, mientras que otros compuestos como los contaminantes emergentes, que pueden presentar interacciones por enlaces de hidrógeno o distintas modalidades de dipolos, presentan mayores interacciones. Esto puede indicar que los compuestos lipofílicos tipo PAHs tendrían más tendencia a atravesar la membrana plasmática que los contaminantes emergentes. Estos resultados, son muy preliminares, y sería necesario el desarrollo de otras columnas con los distintos tipos de interacciones que están presentes en la membrana plasmática.

Como perspectivas futuras se propone la mejora de la fase estacionaria mediante la optimización de la mezcla de polimerización, para conseguir fases sólidas con mayores áreas superficiales, y por tanto, mayores eficacias separativas. Además, se propone tal y como estaba previsto inicialmente en este TFG el desarrollo de fases sólidas que contengan los distintos tipos de interacción que pueden ayudar a predecir la biodisponibilidad de los compuestos. Entre estas nuevas fases estacionarias, cabe destacar que se pretende en un futuro cercano, modificar las columnas con liposomas de PC modificados (conteniendo otras sustancias presentes en la membrana plasmática como el colesterol o la AGP) a través del grupo fosfato a la superficie del monolito. Estas columnas, podrían proveer de todos los tipos de interacción que podrían explicar de manera más precisa la biodisponibilidad de los compuestos, y por tanto obtenerse mejores correlaciones con los datos obtenidos mediante metodologías *in vivo*.

6. Bibliografía

- [1] Dahlgren, D., Hans, L., Intestinal Permeability and Drug Absorption: Predictive Experimental, Computational and In Vivo Approaches. *Pharmaceutics*. 2019, 11, 411.
- [2] Le, J., Biodisponibilidad de los fármacos, <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/farmacología-clínica/farmacocinética/biodisponibilidad-de-los-fármacos> (last time accessed: May 25, 2020).
- [3] Di, L., Kerns, E. H., Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization. *Academic Press*. 2015, pp. 1–3.
- [4] Balimane, P. V., Chong, S., Morrison, R. A., Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2000, 44, 301–312.
- [5] Angulo, A. A., Galindo, A. R., Avendaño, R. C., Pérez, C., *Biología Celular*. 1ª edición. Culiacán, Sinaloa, México, 2012.
- [6] Nicolson, G. L., The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* 2014, 1838, 1451–1466.
- [7] Li, H., Zhao, T., Sun, Z., Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions. *Anal. Chem.* 2017, 37, DOI: 10.1515/revac-2017-0012.
- [8] Subczynski, W. K., High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes Review. *Cell Biochem. Biophys.* 2017, 75, 369–385.
- [9] Vigo., D. de B. F. y C. de la S. F. de B. U. de, Membrana celular. Permeabilidad, fluidez. Atlas de Histología Vegetal y Animal, <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/3-propiedades1.php> (last time accessed: May 25, 2020).
- [10] Gómez, R. P., Nistal, M., Sesna, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., Saéz, F. J., *Biología Celular*. 3ª edición. McGraw-Hill, Madrid, 2007.
- [11] Alam, M. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, M., Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* 2013, 21, 143–152.
- [12] Vrieze, M. De, Extending the possibilities of biopartitioning chromatography for improved prediction of in vivo drug absorption. *Thesis Univ. Gent* 2015.
- [13] Valko, K. L., Application of biomimetic HPLC to estimate in vivo behavior of early drug discovery compounds. *Futur. Drug Discov.* 2019, 1, DOI: 10.4155/fdd-2019-0004.
- [14] Godyń, J., Gucwa, D., Koblrova, T., Novak, M., Soukup, O., Malawska, B., Bajda, M., Novel application of capillary electrophoresis with a liposome coated capillary for prediction of blood-brain barrier permeability. *Talanta* 2020, 217, 121023.
- [15] Grumetto, L., Russo, G., Barbato, F., Immobilized Artificial Membrane HPLC Derived Parameters vs PAMPA-BBB Data in Estimating in Situ Measured Blood-Brain Barrier Permeation of Drugs. *Mol. Pharm.* 2016, 13, 2808–2816.
- [16] Subirats, X., Muñoz-Pascual, L., Abraham, M. H., Rosés, M., Revisiting blood-brain barrier: A chromatographic approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, 145, 98–109.
- [17] Gao, H., Huang, H., Zheng, A., Yu, N., Li, N., Determination of quantitative retention-activity relationships between pharmacokinetic parameters and biological effectiveness fingerprints of *Salvia miltiorrhiza* constituents using biopartitioning and microemulsion high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2017, 1067, 10–17.
- [18] Vrieze, M., Janssens, P., Szucs, R., van der Eycken, J., Lynen, F., In vitro prediction of human intestinal absorption and blood–brain barrier partitioning: development of a lipid analog for micellar liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 7453–7466.
- [19] Kouskoura, M. G., Piteni, A. I., Markopoulou, C. K., A new descriptor via bio-mimetic chromatography and modeling for the blood brain barrier (Part II). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019, 164, 808–817.
- [20] Xuan, X., Xu, L., Li, L., Gao, C., Li, N., Determination of drug lipophilicity by phosphatidylcholine-modified microemulsion high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.* 2015, 490, 258–264.
- [21] Russo, G., Graduate School of Pharmaceutical Science for the Degree of Doctor of Philosophy Study of the Mechanisms of Drug Passage Through Biological Barriers Aimed To Optimize Bioavailability and / or Blood-Brain. *Tesis Univ. NAPLES FEDERICO II*. n.d.
- [22] Herrera Ruiz, D., Hernández Baltazar, E., Espinosa Lara, J. C., Luz Martínez, I. D. L., Beltrán Torres, A. A., Martínez Alejo, J. M., Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos. *Rev. Mex. ciencias Farm.* 2012, 43, 18–32.
- [23] Valkó, K. L., Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 130, 35–54.

- [24] Wiedmer, S. K., Riekkola, M. L., Jussila, M. S., Phospholipids and liposomes in liquid chromatographic and capillary electromigration techniques. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2004, 23, 562–582.
- [25] Pidgeon, C., Venkataram, U. V., Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids. *Anal. Biochem.* 1989, 176, 36–47.
- [26] Tsopelas, F., Malaki, N., Vallianatou, T., Chrysanthakopoulos, M., Vrakas, D., Ochsenkühn-Petropoulou, M., Tsantili-Kakoulidou, A., Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2015, 1396, 25–33.
- [27] Droge, S. T. J., Hermens, J. L. M., Rabone, J., Gutsell, S., Hodges, G., Phospholipophilicity of C: XHyN⁺ amines: Chromatographic descriptors and molecular simulations for understanding partitioning into membranes. *Environ. Sci. Process. Impacts* 2016, 18, 1011–1023.
- [28] Wang, Q., Peng, K., Chen, W., Cao, Z., Zhu, P., Zhao, Y., Wang, Y., Zhou, H., Jiang, Z., Development of double chain phosphatidylcholine functionalized polymeric monoliths for immobilized artificial membrane chromatography. *J. Chromatogr. A* 2017, 1479, 97–106.
- [29] Moravcová, D., Carrasco-Correa, E. J., Planeta, J., Lämmerhofer, M., Wiedmer, S. K., Phosphatidylcholine covalently linked to a methacrylate-based monolith as a biomimetic stationary phase for capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2015, 1402, 27–35.
- [30] Salary, M., Hadjmohammadi, M., Human serum albumin-mimetic chromatography based hexadecyltrimethylammonium bromide as a novel direct probe for protein binding of acidic drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 114, 1–7.
- [31] Lasić, K., Bokulić, A., Milić, A., Nigović, B., Mornar, A., Lipophilicity and bio-mimetic properties determination of phytoestrogens using ultra-high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2019, 33, e4551.
- [32] Moon, Y. J., Sagawa, K., Frederick, K., Zhang, S., Morris, M. E., Pharmacokinetics and Bioavailability of the Isoflavone Biochanin A in Rats. *AAPS J.* 2006, 8, E433–E442.
- [33] De Vrieze, M., Verzele, D., Szucs, R., Sandra, P., Lynen, F., Evaluation of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine-based immobilized artificial membrane liquid chromatography to predict drug penetration across the blood-brain barrier. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 6179–6188.
- [34] Bocian, S., Buszewski, B., Comparison of retention properties of stationary phases imitated cell membrane in RP HPLC. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015, 990, 198–202.
- [35] Soriano-Meseguer, S., Fuguet, E., Port, A., Rosés, M., Estimation of skin permeation by liquid chromatography. *ADMET DMPK* 2018, 6, 140–152.
- [36] Čudina, O., Biopartitioning Micellar Chromatography Partition Coefficient Micelle/Water as a Potential Descriptor for Hydrophobicity in Prediction of Oral Drug Absorption. *Anal. Lett.* 2012, 45, 677–688.
- [37] Escuder-Gilabert, L., Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption. *J. Chromatogr. B* 2003, 797, 21–35.
- [38] Molero-Monfort, M., Escuder-Gilabert, L., Villanueva-Camañas, R. M., Sagrado, S., Medina-Hernández, M. J., Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001, 753, 225–236.
- [39] Hadjmohammadi, M., Salary, M., Biopartitioning micellar chromatography with sodium dodecyl sulfate as a pseudo α 1-acid glycoprotein to the prediction of protein–drug binding. *J. Chromatogr. B* 2013, 912, 50–55.
- [40] Dobričić, V., Savić, J., Nikolic, K., Vladimirov, S., Vujić, Z., Brborić, J., Application of biopartitioning micellar chromatography and QSRR modeling for prediction of gastrointestinal absorption and design of novel β -hydroxy- β -arylalkanoic acids. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017, 100, 280–284.
- [41] Waters, L. J., Shokry, D. S., MB Parkes, G., Predicting human intestinal absorption in the presence of bile salt with micellar liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2016, 30, 1618–1624.
- [42] Shokry, D. S., Waters, L. J., Parkes, G. M. B., Mitchell, J. C., Prediction of human intestinal absorption using micellar liquid chromatography with an aminopropyl stationary phase. *Biomed. Chromatogr.* 2019, 33, DOI: 10.1002/bmc.4515.
- [43] Russo, G., Barbato, F., Grumetto, L., Philippe, L., Lynen, F., Goetz, G. H., Entry of therapeutics into the brain: Influence of exposed polarity calculated in silico and measured in vitro by supercritical fluid chromatography. *Int. J. Pharm.* 2019, 560, 294–305.
- [44] Otsuka, K., Terabe, S., Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants. *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 163–178.
- [45] Deeb, S. El, Iriban, M. A., Gust, R., MEKC as a powerful growing analytical technique.

- Electrophoresis* 2011, 32, 166–183.
- [46] Fernández-Pumarega, A., Amézqueta, S., Fuguet, E., Rosés, M., Tadpole toxicity prediction using chromatographic systems. *J. Chromatogr. A* 2015, 1418, 167–176.
- [47] Ciura, K., Kapica, H., Dziomba, S., Kawczak, P., Belka, M., Bączek, T., Biopartitioning micellar electrokinetic chromatography – Concept study of cationic analytes. *Microchem. J.* 2020, 154, 104518.
- [48] Xu, L., Gao, H., Li, L., Li, Y., Wang, L., Gao, C., Li, N., Establishment of quantitative retention-activity model by optimized microemulsion liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2016, 1478, 10–18.
- [49] Ciura, K., Belka, M., Kawczak, P., Bączek, T., Markuszewski, M. J., Nowakowska, J., Combined computational-experimental approach to predict blood–brain barrier (BBB) permeation based on “green” salting-out thin layer chromatography supported by simple molecular descriptors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, 143, 214–221.
- [50] Cocovi-Solberg, D. J., Worsfold, P. J., Miró, M., Opportunities for 3D printed millifluidic platforms incorporating on-line sample handling and separation. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018, 108, 13–22.
- [51] Carrasco-Correa, E. J., Cocovi-Solberg, D. J., Herrero-Martínez, J. M., Simó-Alfonso, E. F., Miró, M., 3D printed fluidic platform with in-situ covalently immobilized polymer monolithic column for automatic solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta* 2020, DOI: 10.1016/j.aca.2020.03.033.
- [52] Bishop, G. W., Satterwhite-Warden, J. E., Kadimisetty, K., Rusling, J. F., 3D-printed bioanalytical devices. *Nanotechnology* 2016, 27, 284002.
- [53] Mattio, E., Robert-Peillard, F., Vassalo, L., Branger, C., Margaillan, A., Brach-Papa, C., Coulomb, B., 3D-printed lab-on-valve for fluorescent determination of cadmium and lead in water. *Talanta* 2018, 183, 201–208.
- [54] Au, A. K., Huynh, W., Horowitz, L. F., Folch, A., 3D-Printed Microfluidics. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2016, 55, 3862–3881.
- [55] Dong, X., Dong, J., Ou, J., Zhu, Y., Zou, H., Capillary electrochromatography with zwitterionic stationary phase on the lysine-bonded poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolithic capillary column. *Electrophoresis* 2006, 27, 2518–2525.
- [56] Du, T., Liu, B., Hou, X., Zhang, B., Du, C., Covalent immobilization of glucose oxidase on to Poly(St-GMA-NaSS) monodisperse microspheres via BSA as spacer arm. *Appl. Surf. Sci.* 2009, 255, 7937–7941.
- [57] Gupta, V., Beirne, S., Nesterenko, P. N., Paull, B., Investigating the effect of column geometry on separation efficiency using 3D printed liquid chromatographic columns containing polymer monolithic phases. *Anal. Chem.* 2018, 90, 1186–1194.
- [58] Ma, L., Li, J., Zhao, J., Liao, H., Xu, L., Shi, Z. G., Penetrable silica microspheres for immobilization of bovine serum albumin and their application to the study of the interaction between imatinib mesylate and protein by frontal affinity chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016, 408, 805–814.