

Respecto al tiempo de contacto, pruebas previas realizadas a 12 h nos indicaron que la adsorción no se completaba llegando a un máximo de adsorción para Cu (II) de aproximadamente la mitad del que se consigue al aumentar 12 h de contacto. De los resultados referidos en las tablas se deduce que el máximo de adsorción se completa a las 24 h y que no es necesario un tiempo de contacto mayor, ya que la diferencia de adsorción observada al aumentar el contacto de 24 a 48 h es prácticamente insignificante. Este hecho se produce para los dos iones metálicos en estudio.

3.2.2. RESINA DE ÁCIDO FOSFÍNICO

Para la resina de ácido fosfínico, SD3, los valores de capacidad de adsorción se recogen en la Tabla VI.

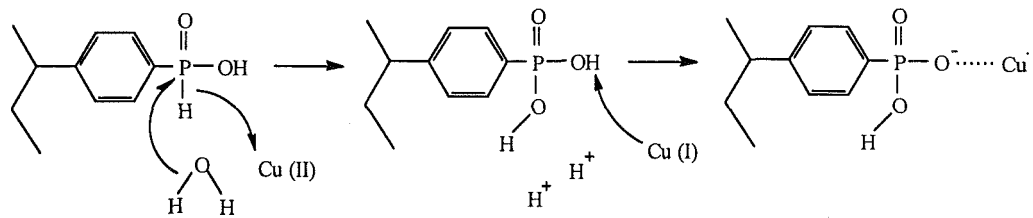
Tabla VI. Resultados obtenidos para la capacidad de intercambio iónico de la resina de ácido fosfínico a diferentes concentraciones de ion metálico inicial. Datos obtenidos a 24 y 48 h de contacto. Los valores de capacidad se dan con una imprecisión de $\pm 0,001$ mmoles Cu (II) o Zn (II) adsorbidos/mequiv de resina.

Concentración (mM)	Cu (II)		Zn (II)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
20	0,0386	-----	0,2438	-----
30	0,5252	-----	0,4498	-----
40	0,5225	0,4938	0,3189	0,2860
80	0,6291	0,9069	0,4054	-----
120	0,9408	0,9532	0,4103	0,5116

El análisis de los valores de esta Tabla nos vuelve a indicar que la adsorción de los iones Cu (II) y Zn (II) por la resina no supone una reacción desplazada hacia la formación del complejo Me (II)-resina.

En este caso, la adsorción de Cu (II) es superior a la del Zn (II) (aprox. el doble), contrariamente a lo que ocurría en la resina de ácido fosfónico. Este hecho podría atribuirse a la doble funcionalidad de la resina. Así, para el cobre sería posible la oxidación del H fosfínico a -OH fosfónico, con la consiguiente reducción de Cu (II) a Cu (I) ($E^{\circ} = 0,34$ V), lo cual aumentaría la probabilidad de incorporar más de un ión Cu (II) al polímero en estudio.

El posible mecanismo en la adsorción de Cu (II) por parte de la resina de ácido fosfónico se muestra a continuación,



Por el contrario, el ión Zn (II) tiene menos tendencia a la reducción ($E^{\circ} = -0,76$ V), de esta forma, la posibilidad anterior no sucedería, lo que explica la disminución en la adsorción de este metal.

3.2.3. RESINA DE ÉSTER FOSFÓNICO

Para la resina de éster fosfónico, SD12, los valores de capacidad de intercambio iónico se recogen en la Tabla VII.

Tabla VII. Resultados obtenidos para la capacidad de intercambio iónico de la resina de éster fosfónico a diferentes concentraciones de ion metálico inicial. Datos obtenidos a 24 h de contacto. Los valores de capacidad se dan con una imprecisión de $\pm 0,001$ mmoles Cu (II) o Zn (II) adsorbidos/mequiv de resina.

Concentración (mM)	20	30	40	80
Cu (II)	-----	0,1974	0,1104	0,1866
Zn (II)	0,0171	0,1102	-----	-----

En este caso, los valores obtenidos indican un acusado descenso en la adsorción tanto de Cu (II) como de Zn (II). Este hecho puede interpretarse como una ausencia de interacción de los grupos de éster fosfónico de la resina y los iones metálicos, siendo de esta forma los grupos -OH presentes, los responsables de la escasa adsorción de los iones metálicos.

3.2.4. RESINA DE ÁCIDO FOSFÓNICO/AMINA

En el caso de la resina de ácido fosfónico/amina, SD14, no existe apenas adsorción por parte de la misma respecto a los iones de interés, Cu (II) y Zn (II). La adsorción obtenida se muestra en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Resultados obtenidos para la capacidad de intercambio iónico de la resina de ácido fosfónico/amina a diferentes concentraciones de ion metálico inicial. Datos obtenidos a 24 h de contacto. Los valores de capacidad se dan con una imprecisión de $\pm 0,001$ mmoles Cu (II) o Zn (II) adsorbidos/mequiv de resina.

Concentración (mM)	30	40
Cu (II)	0,0799	0,0801
Zn (II)	0,0603	0,0605

La baja capacidad observada para Cu (II) y Zn (II) podría ser consecuencia, tanto de la presencia de la amina en el polímero, como de la disminución consiguiente de los grupos fosfónicos. Además, en este caso de resina bifuncional, existe la posibilidad de una fuerte tendencia a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre los hidrógenos fosfónicos que soporta el grupo -OH y el nitrógeno amínico. La consecuente estabilización del ión hidrógeno en la resina tendría como consecuencia una mayor dificultad para el intercambio con los iones metálicos. De aquí la obtención de valores tan pequeños de capacidad de adsorción.

3.3. DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE ADSORCIÓN DE LAS RESINAS

Los resultados obtenidos en los experimentos correspondientes a la velocidad de adsorción de los iones metálicos por las resinas se expresaron en la forma $-\ln(C/C_0)$ frente al tiempo. En este caso, la linealidad de los datos nos indicará una velocidad de adsorción correspondiente a una reacción de primer orden.

Los resultados obtenidos para Cu (II) utilizando las resinas SD1 y SD3 están representados en la Figura 4.

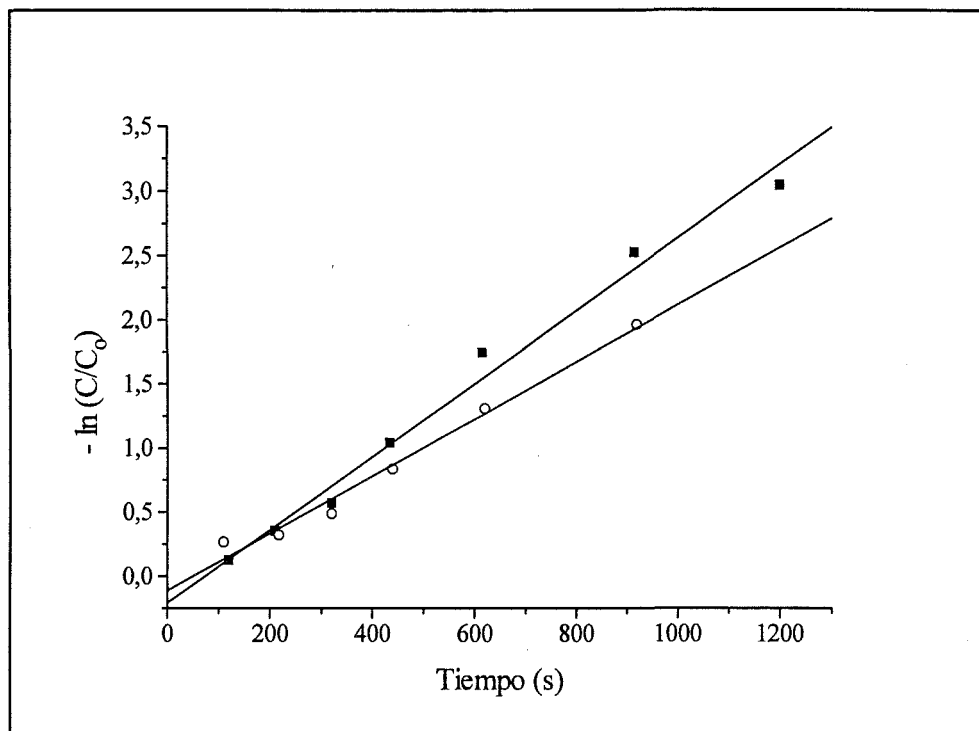


Figura 4. Representación de $-\ln(C/C_0)$ frente al tiempo en la adsorción de Cu (II) para las resinas SD1 (■) y SD3 (○).

En la Figura 5 están representados los resultados obtenidos para Zn (II) utilizando las resinas SD1 y SD3.

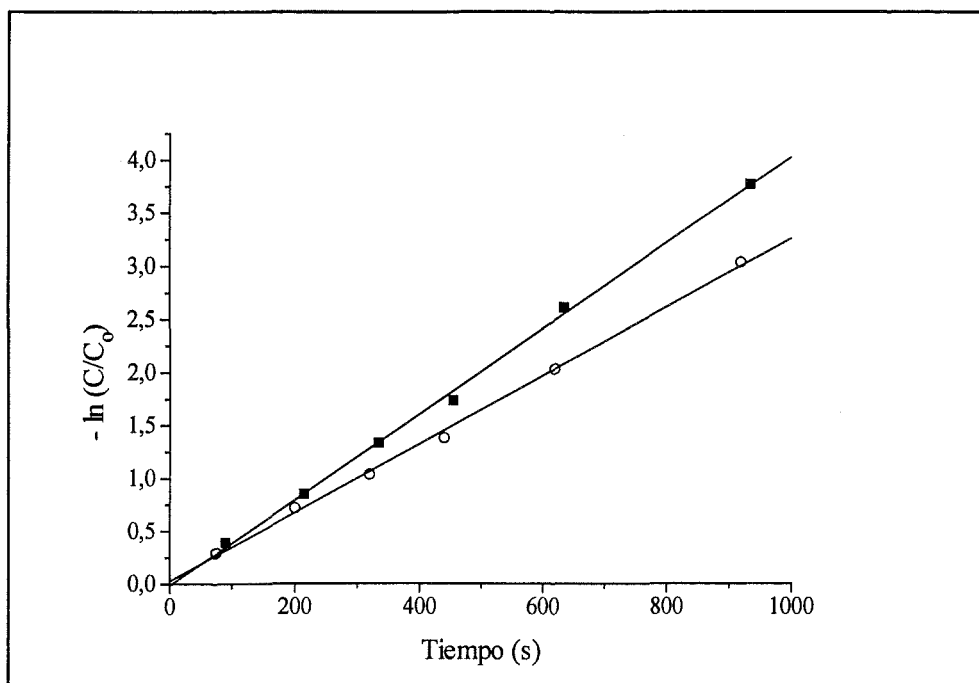


Figura 5. Representación de $-\ln(C/C_0)$ frente al tiempo en la adsorción de Zn (II) para las resinas SD1 (■) y SD3 (○).

En ambos casos se observa una buena linealidad en las relaciones mencionadas, lo cual nos indica las cinéticas de primer orden correspondientes.

Por otro lado, teniendo en cuenta estos resultados, se realizó un tratamiento numérico utilizando el programa KILET,³⁶ con el que determinamos el valor de la constante de velocidad de adsorción siguiendo el modelo de primer orden antes mencionado. Los resultados se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX. Comparación de los resultados obtenidos mediante el tratamiento gráfico y el programa KILET.

Resina	KILET		GRÁFICAMENTE	
	SD1	SD3	SD1	SD3
$K_{Cu} (s^{-1})$	$(1,85 \pm 0,09)10^{-3}$	$(2,13 \pm 0,15)10^{-3}$	$(2,23 \pm 0,15)10^{-3}$	$(2,84 \pm 0,15)10^{-3}$
$K_{Zn} (s^{-1})$	$(3,26 \pm 0,08)10^{-3}$	$(3,97 \pm 0,08)10^{-3}$	$(3,23 \pm 0,07)10^{-3}$	$(4,04 \pm 0,09)10^{-3}$

Como puede observarse existe una buena concordancia entre los valores obtenidos gráficamente y los calculados mediante el programa KILET.

Estos resultados indican, por un lado, una diferencia apreciable en las velocidades de adsorción de Cu (II) y Zn (II), siendo para este último prácticamente el doble; por otro lado, se observa una velocidad de adsorción ligeramente superior en el caso de la resina de ácido fosfínico que el caso de la resina de ácido fosfónico, esta ligera diferencia entre las resinas podría atribuirse al mayor carácter quelatante de la resina portadora de ácido fosfínico respecto a la de fosfínico.

Los datos correspondientes a las resinas SD12 y SD14 se muestran en la Figuras 6 y 7, respectivamente, en ninguno de los casos se observa la linealidad obtenida para las resinas SD1 y SD3.

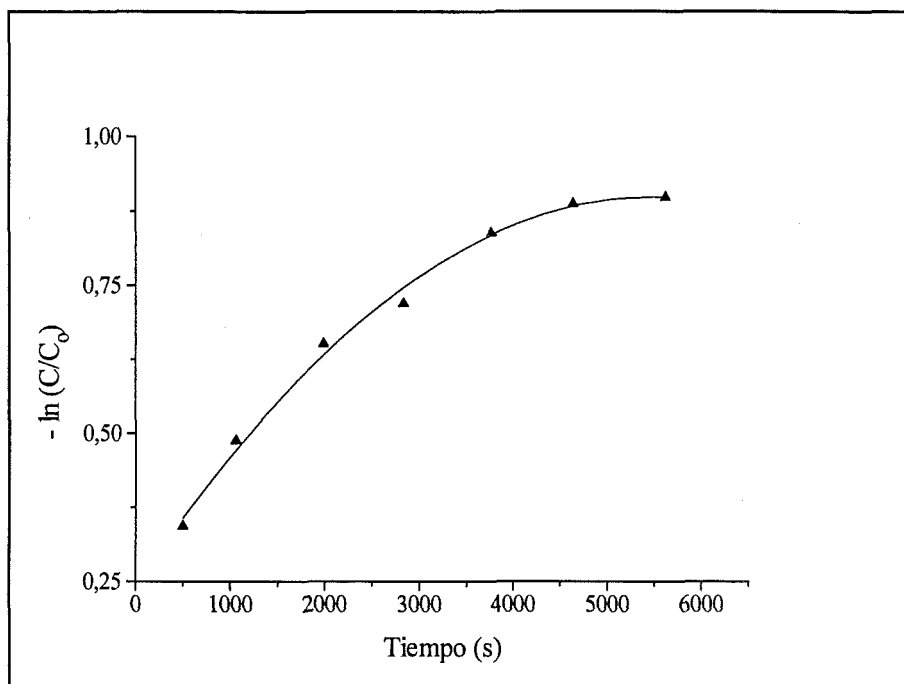


Figura 6. Representación de $-\ln(C/C_0)$ frente al tiempo en la adsorción de Cu (II) para la resina SD12 (\blacktriangle).

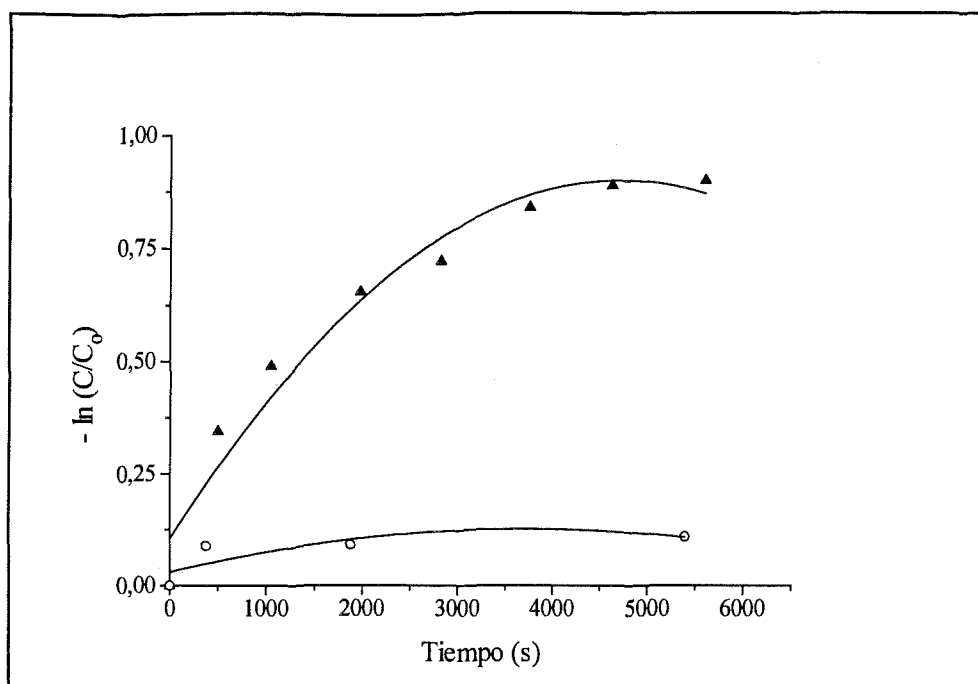


Figura 7. Representación de $-\ln(C/C_0)$ frente al tiempo en la adsorción de Zn (II) para las resinas SD12 (▲) y SD14 (○).

Debido a la falta de linealidad de los datos, hemos supuesto, en el modelo de comportamiento cinético, una contribución apreciable de la reacción de desorción. Es por ello que, utilizando el programa KILET, hemos calculado tanto la constante de adsorción (K_1) como la de desorción (K_{-1}).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla X. En este caso se observa una mayor similitud entre las velocidades de adsorción de Cu (II) y Zn (II) con la resina de éster fosfónico que para el caso de utilizar la resina bifuncional de ácido fosfónico/amina. Los valores de constante de velocidad de adsorción son muy pequeños y para el caso del Cu (II) difícilmente apreciables. Este hecho se corresponde con la escasa capacidad de adsorción de la resina.

Tabla X. Resultados obtenidos en la adsorción de Cu (II) y Zn (II) para las resinas SD12 y SD14 utilizando el programa KILET.

Resina	SD12	SD16
$K_{Cu} (s^{-1})$	$K_1 (5,22 \pm 1,23) 10^{-4}$ $K_{-1} (8,61 \pm 2,48) 10^{-4}$	-----
$K_{Zn} (s^{-1})$	$K_1 (6,35 \pm 0,80) 10^{-4}$ $K_{-1} (4,78 \pm 0,86) 10^{-4}$	$(1,38 \pm 0,06) 10^{-7}$

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Myasoedova, G.V. and Savvin, S.B., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **17**, 1 (1986).
2. Pirkle, W.H. and Pochapsky, T.C., "*Advances in Chromatography*", Vol. 27, chap. 3; Giddings, J.C., Grushka, E. and Brown, P.R., Eds.; Marcel Dekker, New York, (1987).
3. Porath, J., *Biotech. Progr.*, **3**, 14 (1987).
4. Vernon F., *Selec. Annu. Rev. Anal. Sci.*, **2**, 83 (1972).
5. De, A.K., Khopkar, S.M. and Chalmers, R.A., "*Solvent Extraction of Metals*", Van Nostrand, New York, (1970).
6. Begreev, V. and Freiser, H., *Sep. Sci. Technol.*, **17**, 751 (1982).
7. Ritcey, G.M. and Ashbrook, A.W., U.S. Patent 3 438 768 (1969).
8. Kim, T.K., Mooney, R.W. and Chiola, V., *Sep. Sci. Technol.*, **3**, 467 (1968).
9. Agett, J. and Udy, D.J., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **32**, 2802 (1970).
10. Bortnick, N.M., U.S. Patent 3 037 052 (1962).
11. Blake, W.E. and Randle, J., *J. Appl. Chem.*, **17**, 358 (1967).
12. Dorfner, K., "*Ion Exchangers*", (Ann Arbor, MI, Ann Arbor Science), 174 (1972).
13. Fisher, J.W., and Vivjurka, A.J., Conference on Ion Exchange, London, (1969).
14. Brajter, K. and Miazek, I., *Talanta*, **28**, 759 (1981).
15. Boyd, G.E., Schubert, J. and Adamson, A.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2818 (1947).
16. Weaver, B., in "*Ion Exchange and Solvent Extraction*", Marinsky, J.A. and Marcus, Y., Eds., Vol. 6, Marcel Dekker, New York, (1966).
17. Soldatov, V.S. and Manenok, G.S., *Russ. J. Phys. Chem.*, **41**, 1192 (1967).
18. Marhol, M., Beranova, H. and Cheng, K.L., *J. Radioanal. Chem.*, **21**, 177 (1974).
19. Bayer, E., Grathwol, P.A. and Geckeler, *Angew. Makromol. Chem.*, **113**, 141 (1983).
20. Mikes, O., Strop, P., Hosomska, Z., Smrz, M., Frydrychova, A. and Bares, M., *J. Chromatogr.*, **261**, 363 (1983).
21. Bartulin, J., Cárdenas, G. and Maturana, H., *Hydrometallurgy*, **8**, 137 (1982).
22. Walsh, E.N., Beck, T.M. and Toy, A.D.F., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4455 (1956).
23. Choppin, G.R., *Sep. Sci. Technol.*, **16**, 1113 (1981).
24. "*CRC Handbook of Chemistry and Physics*", 64th Edition, Weast, R.C., Astle, M.J. and Beyer, W.H., Eds., D-158, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, (1983).
25. Alexandratos, S.D., Strand, M.A., Quillen, D.R. and Walder, A.J., *Macromolecules*, **18**, 829 (1985).
26. Alexandratos, S.D., Wilson, D.L., Strand, M.A., Quillen, D.R., Walder, A.J. and McDowell, W.J., Reprinted from *Macromolecules*, **18**, 835 (1985).
27. Frank, A.W., *J. Org. Chem.*, **24**, 966 (1956).

28. Leyden, D.E. and Patterson, T.A., *Anal. Chem.*, **47**, 733 (1975).
29. Sekine, T., *Acta Chem. Scand.*, **19**, 1526 (1965).
30. Antikainen, P.J. and Dyrssen, *Acta Chem. Scand.*, **14**, 86 (1960).
31. Muller, W. and Diamond, R.M., *J. Phys. Chem.*, **70**, 3469 (1966).
32. Coleman, C.F., Brown, K.B., Moore, J.G. and Crouse, D.J., *Ind. Eng. Chem.*, **50**, 1756 (1958).
33. Sidall, T.H., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **13**, 151 (1960).
34. Harmon, H.D., Peterson, J.R., McDowell, W.J. and Coleman, C.F., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **38**, 155 (1976).
35. Alexandratos, S.D., Quillen, D.R. and Bates, M.E., *Macromolecules*, **20**, 1191 (1987).
36. Havel, J. and González, J.L., *Scripta Fac. Sci. Mat. Univ. Purk. Brno*, **19**, 183 (1989).

CAPÍTULO IV

CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD POR ION METÁLICO INMOVILIZADO (IMAC)
INMOVILIZACIÓN DE Pd (II) SOBRE RESINAS COMERCIALES
Y SU ESTUDIO EN LA SEPARACIÓN DE AMINOÁCIDOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

1.2. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR IÓN METÁLICO INMOVILIZADO (IMAC)

1.3. RESINAS QUELATANTES CON AFINIDAD A IONES DEL PGM

1.4. DESCRIPCIÓN DE LAS RESINAS QUELATANTES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO IMAC

1.5. SEPARACIÓN DE AMINOÁCIDOS

1.6. AMINOÁCIDOS EN ESTUDIO

2. EXPERIMENTAL

2.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

2.2. INSTRUMENTACIÓN

2.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. INMOVILIZACIÓN DE Pd (II) SOBRE LAS RESINAS DESCRITAS

3.2. ESTUDIO TERMODINÁMICO DE LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN DE Pd (II) POR SPHERON OXINE 1000

3.3. ADSORCIÓN DE L-AMINOÁCIDOS SOBRE Pd (II) INMOVILIZADO EN SPHERON OXINE 1000

3.4. ESTUDIO TERMODINÁMICO DE LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN DE L-AMINOÁCIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA IMAC

3.5. ELUCIÓN DE L-AMINOÁCIDO

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La *Cromatografía*¹ fue denominada así por el botánico ruso Mikhail Tswett en 1906, después de sus experimentos en la separación de pigmentos vegetales a través de columnas de vidrio empaquetadas con carbonato cálcico finamente dividido. Estos pigmentos individuales pasan a través de la columna a diferentes velocidades, pudiendo ser separados uno de otro. El aspecto de estos pigmentos separados son como bandas de colores en la columna, debido a ello denominó a la técnica *Cromatografía* (del latín *chroma*, color y *graphein*, escribir).

Las aplicaciones en cromatografía han tenido un fuerte crecimiento desde entonces, sobretodo en las últimas cuatro décadas con el desarrollo de nuevos tipos de técnicas cromatográficas para mejorar los métodos de separación y determinación de mezclas complejas.

Es, sin duda alguna, la técnica analítica más ampliamente utilizada, teniendo aplicación en todas las ramas de la ciencia.

La cromatografía abarca una gran diversidad de métodos que permiten separar componentes de mezclas complejas, siendo algunas de estas separaciones imposibles por otros métodos.

En todas las separaciones cromatográficas la muestra está disuelta en una *fase móvil*, la cual puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil es forzada a atravesar una *fase estacionaria* inmisible, la cual está fijada en una columna o en la superficie de un sólido.

La separación de los componentes individuales tiene lugar principalmente por las diferencias de afinidad por la fase estacionaria: los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente en el flujo de la fase móvil, por el contrario, los componentes que son ligeramente retenidos en la fase estacionaria la atraviesan rápidamente.

Como consecuencia de estas diferencias de movilidad, los componentes de la muestra son separados en bandas y pueden ser analizados tanto cualitativa como cuantitativamente.

1.1.1. CLASES DE CROMATOGRAFÍA

La cromatografía se divide en varias clases dependiendo del tipo de equilibrio que tiene lugar. De esta forma podemos diferenciar básicamente cinco clases de cromatografía:²

1.1.1.1. Cromatografía de adsorción

1.1.1.2. Cromatografía de reparto

1.1.1.3. Cromatografía de intercambio iónico

1.1.1.4. Cromatografía de exclusión molecular

1.1.1.5. Cromatografía por afinidad

1.1.1.1. Cromatografía de adsorción

Se basa en las interacciones entre el soluto y los lugares activos de un sólido adsorbente, utilizado como fase estacionaria.

Es la forma más antigua de la cromatografía introducida por M. Tswett a principios de siglo. El adsorbente es generalmente un sólido activo, conteniendo poros con una gran superficie tal como sílice o alúmina. Los lugares activos interactúan con los grupos funcionales polares de los compuestos que van a ser separados. La porción no polar (hidrocarburo) de una molécula tiene una influencia menor en el proceso de separación, por ejemplo, podemos separar alcoholes de hidrocarburos aromáticos.

1.1.1.2. Cromatografía de reparto

En esta técnica, una fase estacionaria forma una película delgada en la superficie de un soporte sólido. El soluto se equilibra entre este líquido estacionario y una fase móvil líquida o gaseosa. Si se trata de una fase móvil líquida, las moléculas de soluto se distribuyen entre dos fases líquidas inmiscibles, la fase móvil y la estacionaria, según su solubilidad.

Para evitar la mezcla de las dos fases, los dos líquidos deben tener una gran diferencia de polaridad. Si la fase estacionaria es polar (p.ej. etilenglicol) y la fase móvil no lo es (p.ej. hexano), entonces los compuestos polares serán retenidos más fuertemente. En este caso hablamos de cromatografía en *fase normal*.

Si la fase estacionaria es no polar (p.ej. decano) y la fase móvil si lo es (p.ej. agua), los compuestos polares se favorecen en la fase móvil y eluyen más rápidamente. En este caso hablamos de cromatografía en *fase inversa*.

Por otro lado, dependiendo del tipo de interacción de la fase estacionaria con el soporte, la cromatografía líquida de reparto se denomina *cromatografía líquido-líquido* cuando la fase estacionaria está retenida en la superficie del soporte por adsorción física, y *cromatografía en fase enlazada* si la fase estacionaria está unida mediante enlace químico.

Actualmente esta última es la predominante debido a las desventajas de los sistemas líquido-líquido, siendo una de las más importantes la pérdida de la fase estacionaria por arrastre o dilución en la fase móvil. La Figura 1 muestra un ejemplo esquemático de interacción en ésta última.

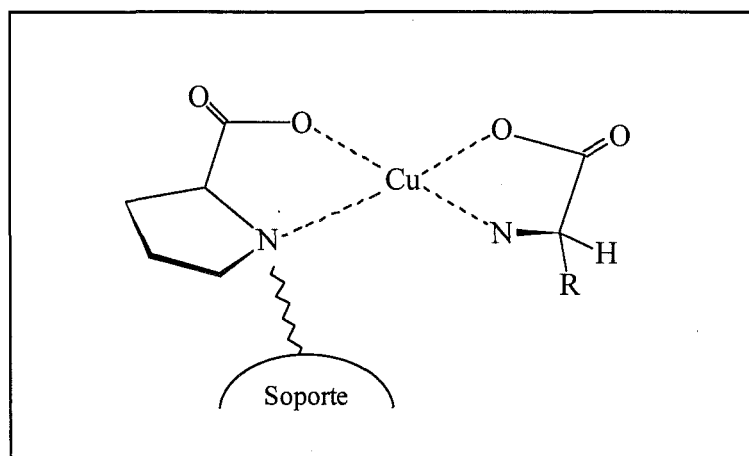


Figura 1. Esquema del complejo ternario formado entre una fase enlazada de L-prolina, el aminoácido a separar y el ion Cu(II) .³

1.1.1.3. Cromatografía de intercambio iónico

Se basa en la diferencia de afinidad por la fase estacionaria de los iones en solución y los iones del mismo signo de dicha fase estacionaria.

Los empaquetamientos en intercambio iónico consisten en una fase porosa sólida, usualmente una resina, donde los grupos iónicos están enlazados químicamente. La fase móvil es normalmente una disolución tampón conteniendo un contraión, cuya carga es opuesta a la de los grupos de la superficie, con lo que existe una competencia entre el analito y el contraión por los grupos iónicos de la fase estacionaria.

Los grupos activos más comunes para resinas de intercambio catiónico son, el ácido sulfónico $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$ (ácido fuerte) y el ácido carboxílico $-\text{COO}^- \text{H}^+$ (ácido débil). Para intercambiadores aniónicos los más comunes son los que contienen aminas cuaternarias $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{OH}^-$ o una amina primaria, $-\text{NH}_3^+ \text{OH}^-$, el primero es una base fuerte y la última una base débil.

Esta técnica tiene una amplia aplicación en química inorgánica en la separación de iones metálicos, y en sistemas biológicos para la separación de compuestos solubles con grupos iónicos como proteínas, nucleótidos y aminoácidos.

1.1.1.4. Cromatografía de exclusión molecular

También denominada cromatografía de permeación en gel o cromatografía de filtración en gel.

Este tipo de cromatografía implica una difusión selectiva de las moléculas de soluto dentro y fuera de la fase móvil, ocupando los poros de una red tridimensional, la cual suele ser un gel o un sólido rígido poroso. El grado de retención dependerá del tamaño del soluto solvatado relativo al tamaño del poro.

Las moléculas pequeñas se introducen en los poros pequeños, mientras que las moléculas grandes atraviesan rápidamente la fase estacionaria, no son atrapados en los poros y se eluirán de la columna las primeras. Así podemos separar compuestos orgánicos de alto peso molecular y biopolímeros de moléculas pequeñas.

1.1.1.5. Cromatografía por afinidad

En cromatografía por afinidad,⁴ la molécula que va a ser purificada es específica y reversiblemente adsorbida por una sustancia enlazada (ligando) que está inmovilizada en un soporte insoluble (matriz). La primera aplicación se utilizó en 1910 para la adsorción selectiva de amilasa sobre una matriz de almidón insoluble. La cromatografía de afinidad ocupa un papel importante en la tecnología de

separación, ya que permite la separación de prácticamente cualquier biomolécula en base a su función biológica o su estructura química.

Para poderse llevar a cabo, deben cumplirse varias condiciones:⁵

- (1) la matriz no debe absorber por sí misma moléculas de forma significativa
- (2) el ligando debe unirse a la matriz sin alteración de sus propiedades de unión
- (3) debe escogerse un ligando cuya unión sea fuerte
- (4) debe ser posible la elución sin la destrucción de la muestra.

La matriz más idónea y por ello la más utilizada es la agarosa (Sephacrose, Pharmacia Fine Chemicals, Inc.), debido a que presenta adsorción mínima, mantiene unas buenas propiedades de flujo después del enlace químico con el ligando y tolera los extremos de pH y fuerza iónica.

Aunque esta técnica ha sido utilizada de forma importante, desde hace aproximadamente diez años, su desarrollo ha sido rapidísimo, siendo ahora de uso común en casi todos los laboratorios que tratan la purificación de sustancias biológicas. El amplio campo que ha abarcado la cromatografía de afinidad en tan poco tiempo, refleja la gran importancia que ha alcanzado, permitiendo separaciones que, mediante métodos convencionales, eran muy difíciles o prácticamente imposibles.

La base de esta técnica es la que se ha utilizado en el presente estudio, concretado en el estudio de la técnica cromatográfica de afinidad por ion metálico inmovilizado (IMAC), que se describirá más adelante.

Por otro lado, y según las características físicas del contacto entre la fase estacionaria y la fase móvil, podemos diferenciar entre,

- *Cromatografía en Columna*, en la que la fase estacionaria está empaquetada en una estrecha columna a través de la cual y bajo el efecto de la gravedad o por presión, la fase móvil es forzada a pasar y,
- *Cromatografía Plana*, en la que la fase estacionaria está soportada en una placa o lámina, la fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por capilaridad o bajo la influencia de la gravedad.

Dentro de la cromatografía en columna, las variantes más convencionales son la *cromatografía de gases (CG)* y la *cromatografía líquida (LC)*. En cromatografía plana los dos métodos más diferenciados son la *cromatografía en capa fina (TLC)* y la *cromatografía en papel (PC)*. Sobre estas técnicas cromatográficas no vamos a extendernos y sólo mencionamos la importancia de sus aplicaciones, ya que el estudio que presentamos se refirió a los fundamentos de la cromatografía de afinidad por ion metálico inmovilizado. Este tipo de cromatografía la describimos a continuación de una forma más detallada.

1.2. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR ION METÁLICO INMOVILIZADO (IMAC)

En 1961 Helfferich⁶ introduce por vez primera el concepto de la utilización de fases estacionarias quelatantes con metales fijados denominando a este método de separación con el término de *Cromatografía por Intercambio de Ligando (ligand-exchange chromatography)*. Este método de separación estaba basado en la adsorción selectiva y sustitución de aminas y otros solutos de pequeño tamaño molecular sobre iones metálicos de carácter duro⁷ inmovilizados en resinas.

Posteriormente, en 1975, Porath y colaboradores,⁸ introducen el término de *Cromatografía de Quelatos Metálicos (Metal Chelate Chromatography)*.

Podemos definir la *Cromatografía de Afinidad por Ion Metálico Inmovilizado (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography)* como un método de separación de alta versatilidad, basado en las interacciones entre moléculas en solución (básicamente biomoléculas tales como aminoácidos) e iones metálicos fijados en un soporte sólido, el cual es usualmente un polímero hidrofílico entrecruzado.

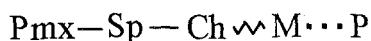
El primer objetivo de utilizar este método fue el de fraccionar las macromoléculas basándose en la afinidad entre los llamados iones metálicos duros y las proteínas. Aunque este principio fundamental no era nuevo, ya que desde principios de siglo se conocía la afinidad de las proteínas por los iones metálicos, es a partir de los trabajos de Porath cuando realmente se relanza la utilización de este método de separación.

De esta forma los sucesivos trabajos de los autores: Porath and Belew,⁹ 1983; Porath and Olín,¹⁰ 1983; El Rassi and Horvath,¹¹ 1986; Sulkowski,¹² 1987; Andersson,¹³ 1988; Porath,¹⁴ 1990; Liu and Shilin,¹⁵ 1990; Birkenmeir,¹⁶ 1991; Porath,¹⁷ 1991; Yipp,¹⁸ 1992; Herve,¹⁹ 1992; Chaga,²⁰ 1992; Porath,²¹ 1992; Zachariou,²² 1994, y muchos otros, dan muestras de ello.

1.2.1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE IMAC

El ion metálico fijado en una matriz polimérica insoluble es la característica y la parte más esencial del centro de adsorción, y debe estar localizado en las posiciones de la red reticular del polímero que permitan una mayor accesibilidad para la complejación.²¹

La formación del complejo entre el ion metálico, el polímero y la proteína puede ser expresado de la siguiente forma:



o más simplificada aún:



donde,

Pmx: matriz polimérica

Sp: brazo espaciador

Ch: quelatante (o grupo funcional)

Ch: quelatante inmovilizado (es decir, el adsorbente quelatante)

M: ion metálico

P: proteína o péptido

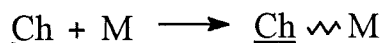
\rightsquigarrow simboliza un enlace más fuerte que ...

1.2.1.1. Proceso de adsorción

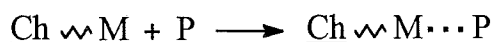
La formación del llamado compuesto de adsorción tiene lugar en dos etapas:

- a) Inmovilización del ion metálico por formación de un quelato
- b) Adsorción de una proteína, péptido o aminoácido

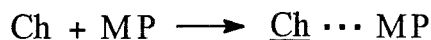
En ambas etapas el ion metálico actúa como un aceptor de electrones o ácido de Lewis. Si no tenemos en cuenta la formación de enlaces débiles con moléculas de agua o iones del tampón que no tienen influencia en los procesos de adsorción y desorción (elución), podemos escribir la primera reacción como:



En el segundo paso se da la reacción:

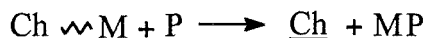


En el caso que $\underline{\text{Ch}}$ y P sean intercambiables puede darse el proceso conocido como *IMAC reversa*



que puede ser explicado como el proceso que tiene lugar en la adsorción de proteínas en presencia de iones metálicos en la fase móvil.⁹

Por otro lado si la proteína tiene una fuerte afinidad por el ion metálico, también puede darse el caso:

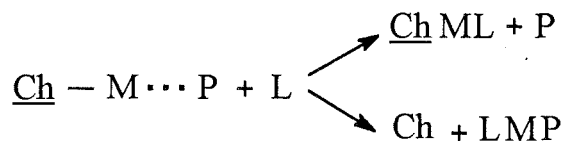


A este proceso se le denomina *transferencia del ion metálico (MIT)*.¹²

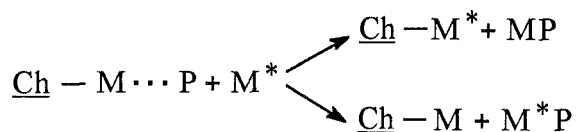
1.2.1.2. Proceso de elución

El proceso de elución puede actuar sobre el enlace metal-quelatante o bien sobre el enlace metal-proteína. Podemos distinguir los siguientes tipos de mecanismo de elución, dependiendo del tipo de eluyente que utilicemos:

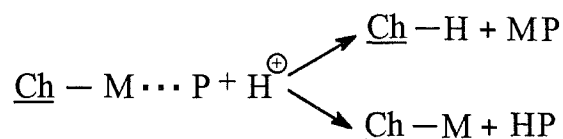
a) *Por un ligando competitivo, L*, actuando como un dador de electrones o base de Lewis:



b) *Por un ion metálico competitivo*, actuando como un ácido de Lewis.



c) *Por protones*, ocupando el lugar de M^+ :



1.2.2. PREPARACIÓN DE LAS COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS

La técnica IMAC se puede efectuar en dos etapas con cinco operaciones consecutivas que son fáciles de automatizar: equilibrado de la columna, introducción de la muestra, separación de la fracción no enlazada (limpieza), elución y regeneración.

Las sustancias se pueden diferenciar en dos categorías: las que tienen afinidad por el soporte y las que no la tienen. En raras ocasiones un adsorbente IMAC es específico y podemos, en una única etapa, aislar el compuesto deseado. Normalmente las sustancias ofrecen diferentes grados de afinidad y pueden ser separadas por una elección apropiada de las condiciones de elución.

1.2.2.1. Elección del ion metálico

Debido a la importancia que tiene el ion metálico (es el centro activo) en el proceso IMAC es conveniente diferenciar a los iones metálicos por la teoría de Pearson.⁷ Esta clasificación facilita la selección de los iones metálicos más apropiados para la técnica IMAC. Pearson sistematizó los iones metálicos en tres categorías: duros, intermedios y blandos. Los iones metálicos duros tienen preferencia por el oxígeno, mientras que los blandos (fácilmente polarizables en un campo eléctrico) tienen preferencia por el azufre. El tipo de iones metálicos intermedios coordinan con el nitrógeno, pero también por el oxígeno y azufre.

Ejemplos de iones metálicos blandos son Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^+ , Ag^+ y Pb^{2+} y los iones metálicos del grupo del platino (PGM). Los enlaces mediante los cuales coordinan estos iones tienen esencialmente carácter covalente. Este tipo de iones metálicos ha sido muy poco estudiado como centro activo (adsorbente) para las proteínas.¹³

Los iones del grupo II y III de la tabla periódica son típicamente duros. Este tipo de iones es el que ha sido más estudiado en la técnica IMAC y, aunque su química de coordinación no ha sido extensamente tratada, se sabe que tienen preferencia por el oxígeno, siendo el enlace de tipo iónico.

El hierro forma iones divalentes y trivalentes, siendo el Fe^{3+} más duro que el Fe^{2+} , mostrando este último características como adsorbente selectivo para fosfoproteínas y organofosfatos.²³⁻²⁵

No existe un límite claro para diferenciar a los iones metálicos intermedios. Parece ser que el bloque 3d es el típico. Iones como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} son típicos intermedios y han sido, sin ningún tipo de duda, los más utilizados en IMAC.

Los iones Zn^{2+} y Ni^{2+} son electroquímicamente estables bajo las condiciones experimentales que se dan en IMAC. Por el contrario Cu^{2+} y Co^{2+} son iones que pueden ser fácilmente reducido y oxidado, respectivamente, sin embargo, nunca se han encontrado reacciones adversas mientras son inmovilizados. Es más, el Cu^{2+} forma enlaces muy fuertes y de alta capacidad con proteínas y péptidos.

Al mismo tiempo, las cinéticas rápidas y reversibles son de primordial importancia en IMAC.¹⁰ La cinética lenta limita la utilidad de iones como Cr^{3+} y Co^{3+} , y algunos de los iones de los elementos de transición.

La química de estos complejos metálicos suele ser distinta mientras se encuentran en solución libre o se hallan enlazados en una matriz polimérica. Por ejemplo, el Cu^{2+} y Ni^{2+} tienen la posibilidad de formar diferentes tipos de complejos (plano cuadrado, tetraédrico, octaédrico, etc.) y son frecuentemente distorsionados cuando son inmovilizados en una matriz polimérica, debido básicamente a impedimentos estéricos. Posiblemente la inmovilización del ion metálico altera su química, así pues, resulta muy difícil efectuar predicciones y deducciones sobre el comportamiento de estos iones cuando están unidos a una base polimérica. La mayoría de estas predicciones se realizan por extrapolación del comportamiento de estos centros activos basados en el conocimiento de complejos similares en solución.

1.2.2.2. Elección del ligando quelatante

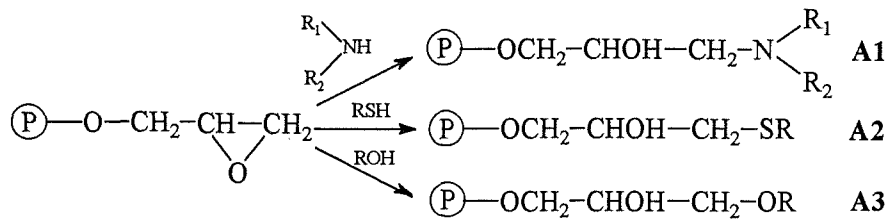
Idealmente el ion metálico debe ser coordinado lo más fuertemente posible en la matriz polimérica. Para lograr este propósito se considera muy adecuado el uso de un quelatante multidentado, con lo cual el número de átomos nucleófilos exceda el número total de lugares de coordinación en el ion metálico.

Como ya se ha comentado, es necesaria la quelatación del ion donde prevalezca la intención de conseguir máxima estabilidad para este centro activo, ya que éste será posteriormente el que deberá reaccionar bien con un aminoácido, proteína o péptido.

Se han realizado numerosos estudios de los grupos funcionales o ligandos quelatantes que son más adecuados para conseguir una técnica IMAC satisfactoria. Habitualmente estos estudios se han basado en el uso de átomos tales como oxígeno, nitrógeno o azufre. Asimismo, es de relevante interés la elección de la matriz polimérica a la cual está unido este ligando quelatante, pero este tema se verá más adelante.

La mayoría de las síntesis sobre nuevos materiales de uso en IMAC se ha basado en la fijación covalente de estos grupos sobre polímeros hidrofílicos.^{26,27}

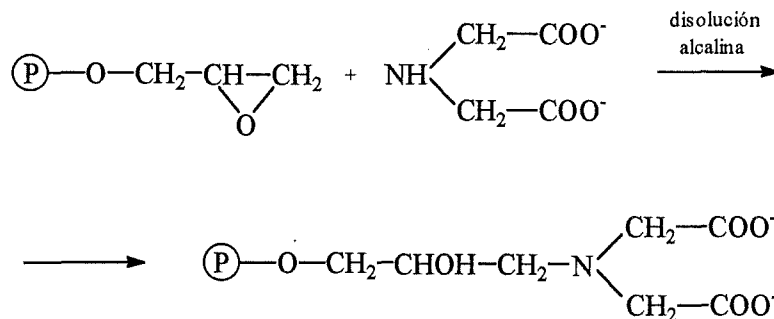
Las contribuciones más relevantes son las que se han realizado derivatizando el grupo epóxido unido a una matriz polimérica (P) .



Este grupo epóxido es muy reactivo y a partir de reacciones sobre él se puede conseguir sintetizar infinidad de grupos funcionales.

Los grupos quelatantes alifáticos se unen al polímero a través de grupos amino o tiol como en A1 o A2. Las poliaminas se usan para formar intermedios en la preparación de los adsorbentes utilizados más extensamente en IMAC, siendo el IDA (ácido iminodiacético), la más simple de todas ellas.

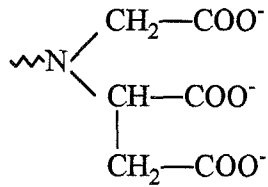
Los llamados *geles IDA*, son comerciales y pueden ser sintetizados por carboximetilación de aminopolímeros entrecruzados. Las condiciones para evitar reacciones laterales son descritas por Hemdan y Porath.^{28,29} De cualquier forma para evitar estas reacciones laterales, el quelatante IDA puede ser obtenido por la unión de IDA a un epoxipolímero.



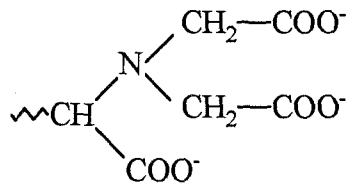
El quelatante IDA es tridentado y con iones metálicos tetra y hexacoordinados, forma un quelato con dos anillos de cinco miembros. IDA enlazado en un soporte de sílice hidrofílica fue por primera vez introducida por Vijayalakshmi^{30,31} y Small *et al.*³² y estudiada por Hovarth,¹¹ Regnier³³ y Karger.³⁴

Los quelatantes obtenidos por carboximetilación de una amina forma quelatos más estables que los correspondientes a quelatantes tridentados.

Los ejemplos más importantes de quelatantes tetradentados utilizados en IMAC son, el polímero del ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp).³⁵⁻³⁷

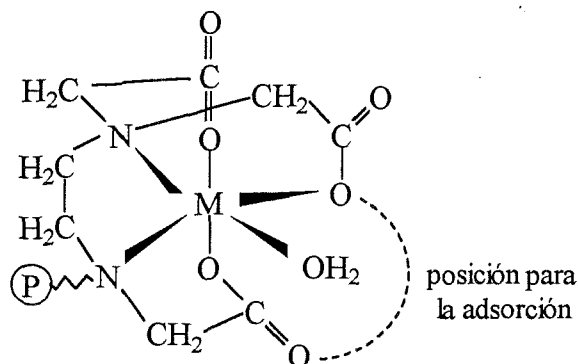


y el ácido triacético nitrilo (NTA 56).³⁸



También han sido estudiados quelatantes pentadentados, siendo el más destacado de todos ellos el Tris (carboximetil)etilendiamina (TED), preparado de la agarosa etilendiamina por carboximetilación.¹⁰ Este quelatante provoca siempre complejos muy fuertes con los correspondientes iones metálicos como consecuencia de la formación de cuatro anillos de cinco átomos.

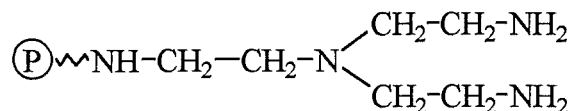
El complejo formado por el polímero de TED con un ion metálico hexacoordinado tiene la estructura siguiente:



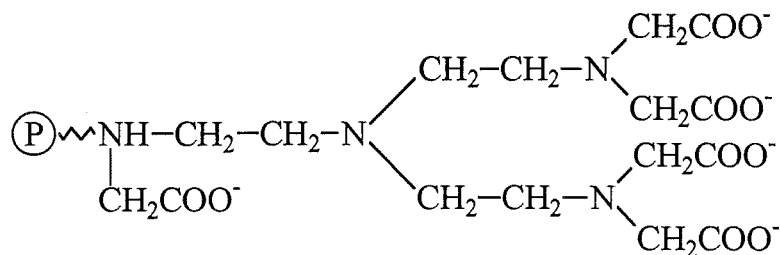
Las aminas alifáticas son quelatantes fuertes y por carboximetilación pueden aumentar su capacidad para formar complejos estables con iones metálicos, siendo muy útiles para la separación eficiente de iones metálicos en soluciones acuosas.

Las aminas alifáticas lineales pueden ser introducidas en el polímero por cualquiera de los átomos de nitrógeno que poseen, con lo cual se obtienen productos conteniendo una gran variedad de isómeros quelatantes posicionales.

Tris(2-aminoetil)amina (TREN), como se puede observar, es simétrica,



Este ligando puede incrementar hasta tres anillos de cinco átomos por la unión de un ion metálico.



1.2.2.3. Elección de la matriz

La matriz polimérica debe consistir en una red molecular permeable a las proteínas, debe ser fuertemente hidrofílica y químicamente inerte así como microbiológicamente resistente a las condiciones de trabajo en IMAC.

Para el tratamiento cromatográfico es conveniente que la matriz esté en forma de pequeñas perlas (5-50 μm) uniformes, rígidas y esféricas.

Agarosa y Sephadex (las primeras matrices utilizadas en IMAC), son muy prácticas para muchas aplicaciones, pero también muestran problemas, ya que se comprimen mucho por las altas presiones que provoca la técnica IMAC, debido básicamente a la utilización de HPLC. Sin embargo, con el uso de compuestos como epiclohidrina se puede evitar esta desventaja, ya que estabiliza los segmentos helicoidales en la matriz de la agarosa, por formación de entrecruzamientos cortos entre unidades de la cadena de polisacáridos.^{39,40}

A partir de este tratamiento se ha llevado a la práctica la mayor producción de la agarosa comercial (como son Sepharose CL-6B y Superosa 6 y 12).

Otras alternativas para aumentar el entrecruzamiento de la agarosa son el uso de *TSK-gel chelate 5PW* consistente en partículas de resina con un centro hidrofóbico y recubiertas de una capa hidrofílica de composición desconocida.⁴¹

1.2.3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA IMAC

La técnica cromatográfica que acabamos de describir supone las siguientes ventajas:²¹

- 1) Posibilidad de separación en una única etapa.
- 2) Es posible aplicar la cromatografía de alta resolución (HPIMAC).
- 3) La capacidad de enlazar proteínas es alta (0,1-10 μM por mL de adsorbente).
- 4) IMAC es aplicable tanto a moléculas pequeñas como grandes.
- 5) Las cinéticas suelen ser rápidas para los iones metálicos.
- 6) La elución es posible utilizando bien un dador de electrones fuerte o bien un quelatante o un ion competitivo del ion metálico adsorbido.
- 7) Es posible la separación tanto de proteínas naturales como desnaturalizadas.
- 8) Disoluciones muy diluidas de proteínas pueden llegar a concentrarse y las proteínas pueden recuperarse cuantitativamente.
- 9) IMAC tiene lugar en el rango de pH fisiológico.
- 10) Los materiales en IMAC son fácilmente regenerados.
- 11) Por elución del metal adsorbido se puede conseguir una recuperación cuantitativa de la proteína.

Por el contrario, la técnica IMAC implica también una serie de inconvenientes:

- 1) El proceso MIT puede tener lugar del adsorbente a la proteína o al revés.
- 2) Es posible la elución del metal, pudiéndose minimizar escogiendo una resina y un ion metálico que tenga alta afinidad por ella.
- 3) Oxidación y catálisis pueden darse en la matriz con iones metálicos inmovilizados.

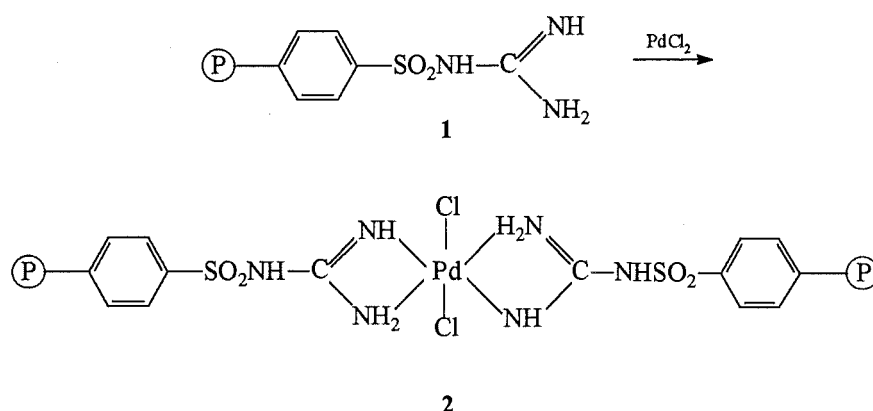
En nuestro caso, hemos escogido Pd (II) como ion metálico para el estudio IMAC. La elección de un ion metálico considerado como *blando*, supone una innovación en la aplicación de esta técnica, ya que, como se comentó anteriormente, en la técnica IMAC se han efectuado numerosos estudios con inmovilización de iones metálicos básicamente duros o intermedios tales como Cu (II), Zn (II) o Fe

(III). Por otro lado, la formación de complejos entre Pd (II) y aminoácidos está bastante favorecida.⁴²

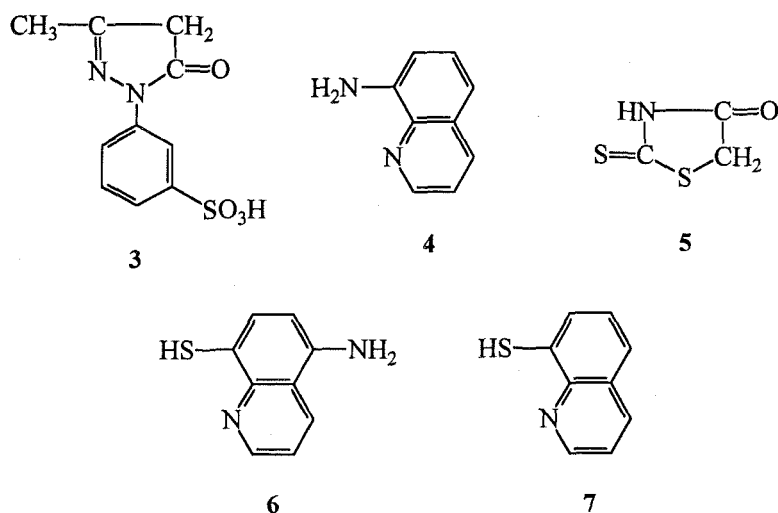
Estas características cabrá esperarlas, en el caso de que el Pd (II) esté coordinado a un grupo quelatante de una matriz polimérica, que es la situación característica de la técnica IMAC.

1.3. RESINAS QUELATANTES CON AFINIDAD A IONES DEL PGM

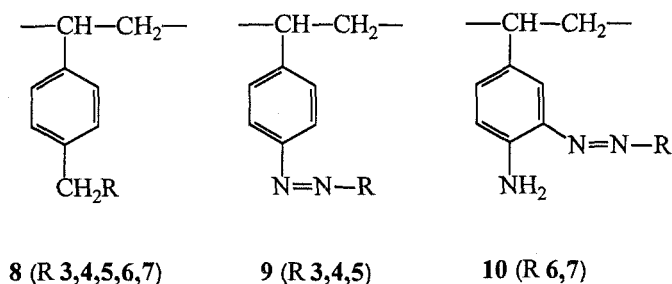
De entre las resinas quelatantes que se han desarrollado, sólo algunas de ellas se han utilizado para la aplicación de recuperación de iones del PGM. Estas resinas incorporan grupos funcionales que poseen afinidad por este grupo de metales. Gulko *et al.*,⁴³ hacen referencia a la resina sulfaguanidina (1), quelatando a Pd (II) (PdCl₂) como el complejo (2).



Myasoedova *et al.*,⁴⁴ prepararon resinas quelatantes conteniendo ligandos de nitrógeno y azufre por sustitución nucleofílica de copolímeros clorometilados con los reactivos 3 a 7 o por procedimientos de diazotización, enlazando copolímeros diazoestirenos con 3, 4 y 5, o bien aminopoliestireno con derivados diazo de 6 y 7.



Los copolímeros 8, (R= 3, 4, 5, 6, 7), 9 (R= 3, 4, 5) y 10 (R= 6, 7) fueron estudiados para la extracción de Pd (II), Pt (IV), Au (III) y Rh (III) de disoluciones 1 M de HCl, HClO₄ y H₂SO₄.

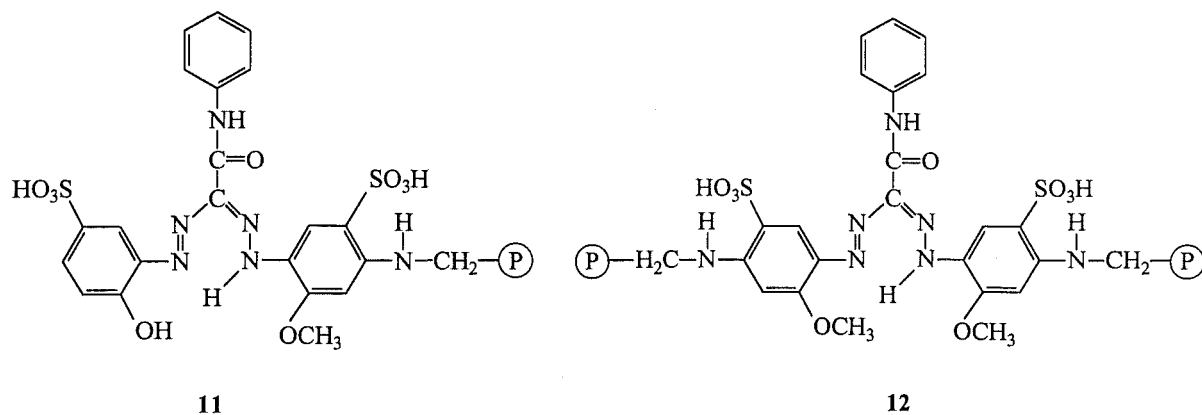


Otros polímeros portadores de nitrógeno son copolímeros de *m*-aminofenol-CH₂O y copolímeros de estireno aminofenol descritos por Sykora *et al.*,⁴⁵ los cuales realizaron estudios de los coeficientes de distribución para Pd (II), Pt (II), Rh (II) y Ir (II) de disoluciones de HCl. Poli-4-vinilpiridina fue patentado para Pd (II) enlazado como el complejo Pd(py)₂Cl₂.⁴⁶

Recientemente, se han efectuado numerosas síntesis de resinas selectivas para PGM. Los trabajos realizados por Kettrup y Grote,⁴⁷⁻⁵⁵ en Alemania, y Hudson,^{56,57} en el Reino Unido, son los más destacados. Los primeros se basaron en su trabajo acerca de 3-fenilcarbamoilformazano utilizado en la determinación fotométrica de Pd (II) para realizar un estudio sobre la inmovilización del grupo formazano en soportes orgánicos e inorgánicos.

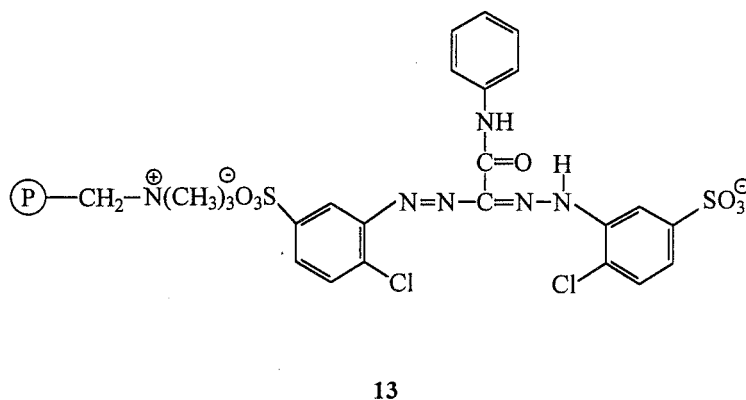
Algunos métodos sintéticos fueron escogidos para la inmovilización de grupos formazanos.^{48,49}

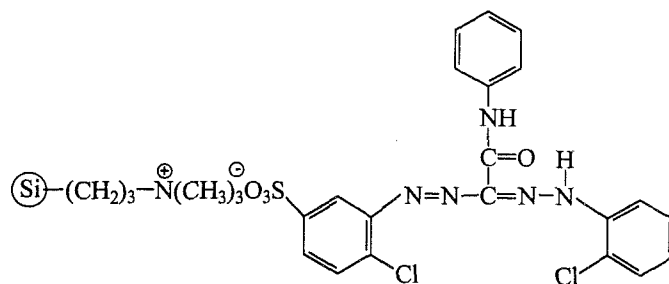
1. Activación del formazano por reacción con 1,3,5-tricloro-S-triazina seguida de una reacción con un grupo amina (aminometilpoliestireno) o grupos hidroxilo (celulosa).
2. Reacción de 1,5-difenil-3-fenilcarbamoilformazano amino sustituido con clorometilpoliestireno (polímeros 11 y 12).



Otra manera diferente es inmovilizar formazanos sulfonados por interacción con grupos amonio cuaternario que ya están inmovilizados sobre sílice (Figura 2),⁵² y similarmente sobre resinas intercambiadoras aniónicas (polímeros **13** y **14**).⁵³

Las resinas con formazano inmovilizado de BioRad tales como AG1x2,⁵¹ fueron designadas por los autores como QF-22, QF-32 (**13**), QF-33 y QF-35 (**14**), conteniendo unos 0,5-0,6 mmol/g de grupos formazanos.





14

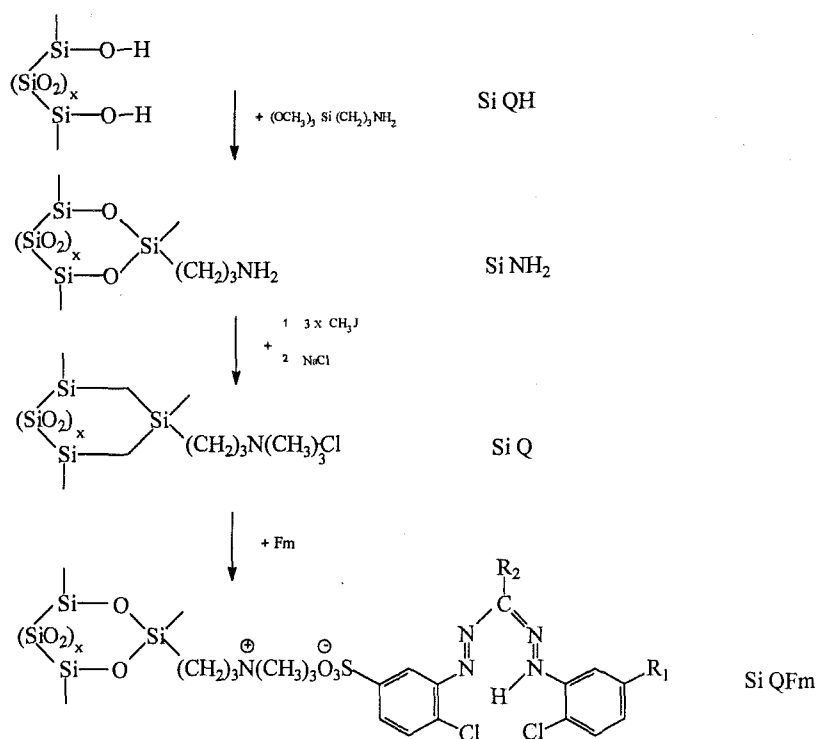
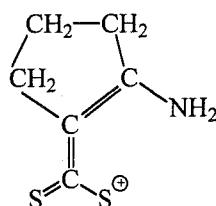


Figura 2. Preparación de resinas de formazano inmovilizadas en sílice.

El estudio y comparación de las resinas de formazano unidas iónicamente a sílice⁵¹ y las entrecruzadas en poliestireno reveló un mejor comportamiento de las resinas basadas en sílice, debido a su excelente cinética.

Comparativamente, el estudio, de la inmovilización de 2-amino-1-ciclopenteno-1-ditioácido (15) a sílice, muestra unas velocidades de adsorción muy altas, pero también una baja selectividad en la quelatación del ion metálico.



15

En su más reciente trabajo, Grote y Kettrup⁵⁶ realizaron la preparación de resinas quelatantes vía interacciones iónicas, sintetizando resinas con azufre tales como ditizona y dihidroditizona, por reacción de clorometilpoliestireno con dihidroditizona para la obtención de la resina 16 seguido de una reducción para la obtención de la resina 17. Estas dos resinas tienen un esqueleto análogo a las resinas de formazano descritas previamente.

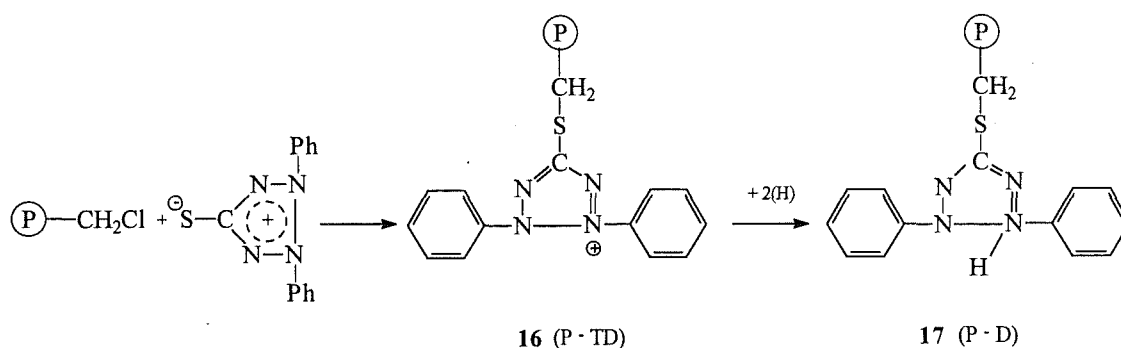
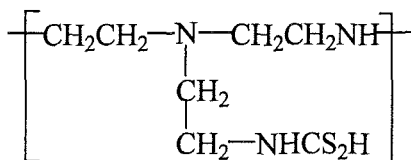


Figura 3. Síntesis de la resina Tretrazolium 16 (P-TD) y de la resina ditizona 17 (P-D).

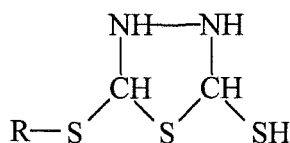
Se examinaron las diferentes afinidades de cada una de estas resinas para los PGM, observándose que muestran diferentes afinidades dependiendo del estado de oxidación, el polímero **17** favorece los estados de oxidación bajos mientras que el polímero **16**, favorece los altos.

En el caso de tratarse de la elución, las condiciones para **16** y **17** son diferentes, el polímero **16** muestra condiciones más favorables, ya que prácticamente la mayoría de los PGM pueden ser eluidos con un 5 % de tiourea, en el caso del polímero **17** es necesario el uso de condiciones más drásticas (6 M HCl o bien 2 M HClO₄).

Hudson^{56,57} ha descrito dos resinas que muestran una gran afinidad por PGM. La primera, poli-[(*N*-ditiocarboxilato)-iminoetiloanohidrógeno iminoetano] (**18**, PIED), preparada a partir de polietilidenamina,⁵³ presenta alta capacidad para este tipo de iones metálicos y también para Cu (II).



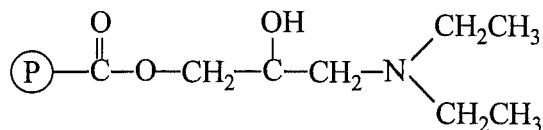
18 (PIED)



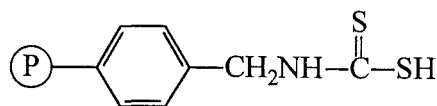
19 (PTD)

El polímero tiaditiazol (**19**, PTD)⁵⁶ tiene una alta capacidad para el PGM y también, como en el caso anterior, para Cu (II).

Un copolímero macroporoso glicidil metacrilato-etilendimetacrilato (**20**) modificado con grupos dietilamina fue estudiado extensamente en el *Institute of Macromolecular Chemistry* de Praga. Este copolímero muestra una buena adsorción para clorocomplejos aniónicos de Pd (II), Rh (III) y Pt (IV), los cuales pueden ser separados unos de otros por elución con ácido nítrico.⁵⁸



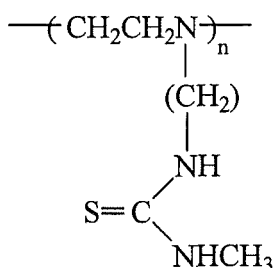
20



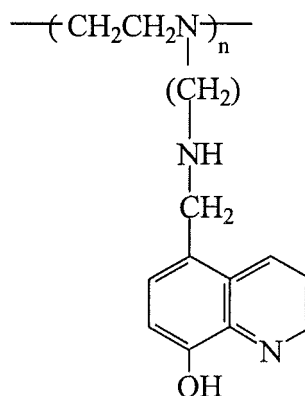
21

Un tipo de resina similar a la PIED (18) es la resina de ácido tiocarbámico (21), descrita por Zhang *et al.*⁵⁹

Bayer y sus colaboradores⁶⁰ utilizaron grupos quelatantes tales como tiourea, ácido iminodiacético y 8-hidroxiquinoleína, para la inmovilización de los mismos en polietilenimina, polivinil amina y ácido poliacrílico. Poli-*N*-isotiurea (22) y poli-8-metilaminohidroxiquinoleína (23) son los que presentan mayor afinidad por los iones metálicos de PGM.



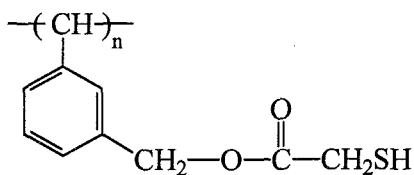
22



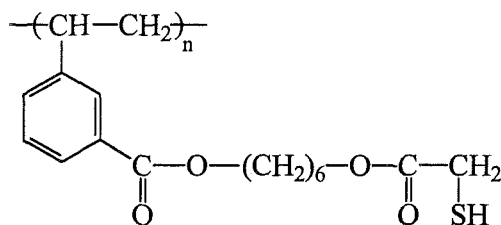
23

Se pueden encontrar una gran cantidad de trabajos sobre resolución cromatográfica mediante el uso de polímeros quelatantes. Fritz, ha descrito algunas resinas incorporando azufre en matrices macroporosas. Las resinas de tioglicolato⁶¹ son un buen ejemplo de ello. De entre ellas cabe destacar la Amberlite XAD-4 (24).

Una resina similar es la (25) donde se incorpora una cadena de seis metilenos, sintetizada a partir de la XAD-4 por acetilación, oxidación del acetil-XAD-4 a carboxi-XAD-4 y esterificación con 1,6-hexanodiol, y posterior esterificación con ácido tioglicólico.⁶²

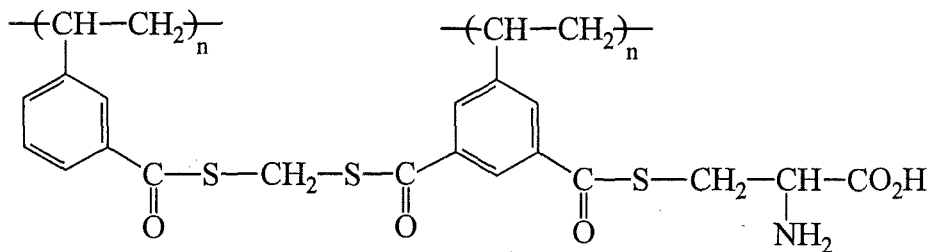


24

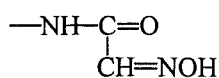


25

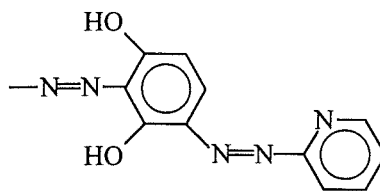
Liu y Sun⁶³ describieron una resina conteniendo grupos L-cisteína (26).



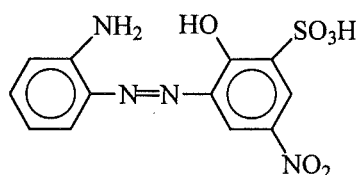
26



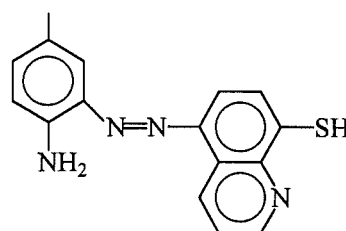
27



28

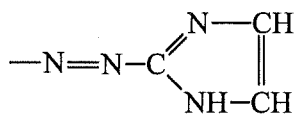


29

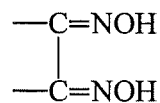


30

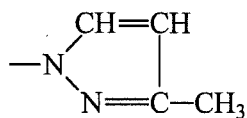
Otros grupos quelatantes selectivos para Pd (II) son los referidos por Sykora *et al.*⁶⁴ (27), Eliseeva *et al.*⁶⁵ y Eccles *et al.*⁶⁶ (28), Myasoedova *et al.*⁶⁷⁻⁷⁰ (29), (30), (31), Hering⁷¹ (32), Myasoedova *et al.*^{72,73} (33), Koster *et al.*⁷⁴, Warshawsky *et al.*⁷⁵ y Ke *et al.*⁷⁶ (34), Burba *et al.*⁷⁷, Griesbach *et al.*⁷⁸ y Bauman *et al.*⁷⁹ (35), Grosh *et al.*⁸⁰ (36), Grote *et al.*^{48,49} (37) y Badargin *et al.*⁸¹ (38).



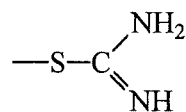
31



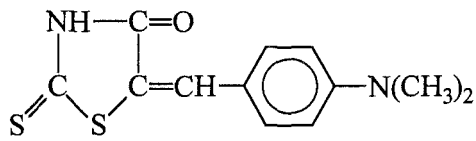
32



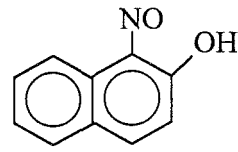
33



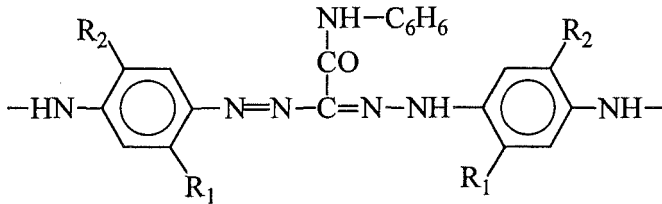
34



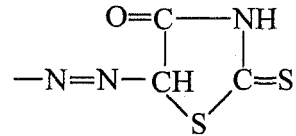
35



36

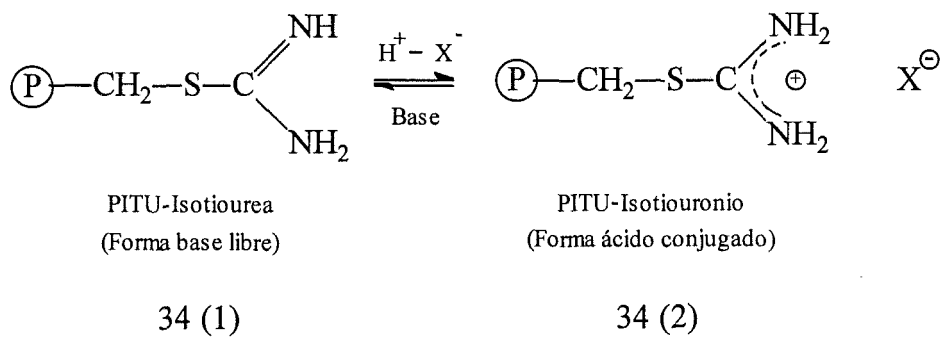


37

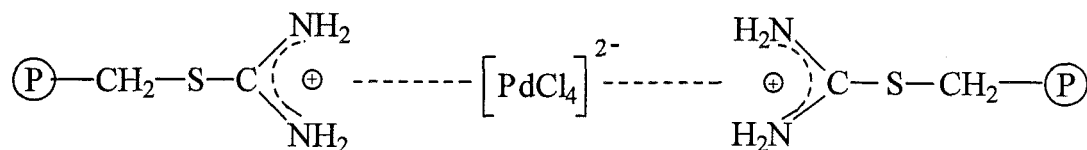


38

Finalmente, cabe destacar la utilización de un tipo de resina en un proceso que se realiza en MINTEK (Sudáfrica), donde los cloro complejos de PGM son concentrados en una resina selectiva conteniendo grupos poliisotiourea (PITU). Este grupo es el mostrado en (34). De este tipo, dos resinas, Sraffion NMRR⁸² y Monivex, son utilizadas debido a su capacidad para quelatar iones de PGM. El comportamiento de estas resinas muestra una dependencia a la concentración de HCl. La explicación al comportamiento de estas resinas a diferente acidez se atribuye^{75,83,84} a sus propiedades de base débil de los grupos funcionales isotiourea, y está sujeto al siguiente equilibrio ácido-base:



Las resinas PITU en la forma isotiourea **34(1)** pueden coordinar con cationes metálicos, pero convertidas en la forma isotiuronio **34(2)** coordinan con aniones metálicos por un mecanismo de intercambio aniónico. Con la coordinación de un ion metálico en su forma aniónica se produce el siguiente mecanismo de reacción:



1.4. DESCRIPCIÓN DE LAS RESINAS QUELATANTES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO IMAC

En la selección del tipo de resina, son de suma importancia dos aspectos: el carácter hidrofílico de la matriz polimérica y la naturaleza química funcional, es decir, los átomos dadores (p.ej. oxígeno, nitrógeno, azufre) y la estructura del grupo.

Entre los polímeros funcionalizados que muestran afinidad por el Pd (II), se escogieron dos tipos de resinas para realizar la inmovilización de este ion metálico: Spheron Oxine 1000⁸⁵ y His·BindTM.⁸⁶ Estas dos resinas cumplen la condición de tener una matriz polimérica altamente hidrofílica.

La elección de Spheron Oxine 1000 se debió básicamente a que el grupo funcional de esta resina es 8-hidroxiquinoleína, molécula de conocida habilidad por el Pd (II).^{60,87,88} Por otro lado, la experiencia de nuestro grupo de investigación en el estudio y aplicación del agente extractante Kelex 100, un derivado de la 8-hidroxiquinoleína, en la separación y transporte de Pd (II),⁸⁹ es otra de las razones para su elección.

La resina His·BindTM (que denominaremos HBR), posee una matriz derivatizada de la agarosa, siendo uno de los tipos de matriz polimérica utilizada primeramente en IMAC.¹⁴

A continuación se realiza una descripción detallada de los dos tipos de resina que han sido utilizadas en este trabajo.

1.4.1. SPHERON® OXINE 1000

La resina Spheron® Oxine 1000 es un intercambiador iónico quelatante debido al contenido de moléculas 8-hidroxiquinoleína (HOxn), enlazadas vía grupos azo en el lateral de una cadena de gel modificado de hidroxietil metacrilato (Figura 4). La estructura del grupo funcional de esta resina se muestra en la Figura 5.

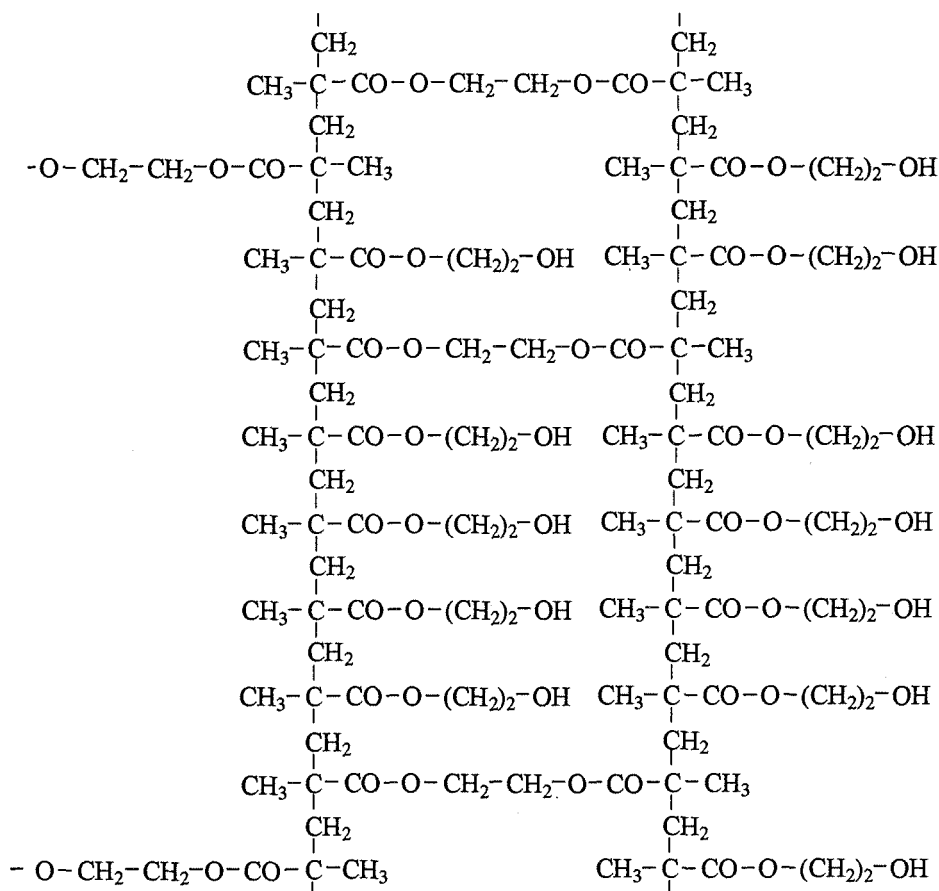


Figura 4. Estructura de la red polimérica de hidroxietil metacrilato.

Además de los grupos quelatantes, Spheron Oxine 1000 contiene grupos hidroxilo neutros, de este modo la selectividad del material depende solamente de la reactividad del grupo 8-hidroxiquinoleína. Como resultado de ello no absorbe metales alcalinos o iones amonio.

Spheron Oxine 1000 difiere marcadamente del resto de los intercambiadores iónicos quelatantes que contienen grupos iminodiacetato, los cuales tienen también las propiedades no selectivas de un intercambiador catiónico carboxílico. La afinidad de esta resina para los iones metálicos duros es muy alta, por ejemplo, a pH 5 es de 0,2-0,3 mmol/g.

Una propiedad muy importante de esta resina es la rapidez con la que consigue el equilibrio de absorción, lo que se atribuye a sus características de poseer tanto una matriz altamente hidrofílica como un grupo quelatante con átomos de oxígeno y nitrógeno.

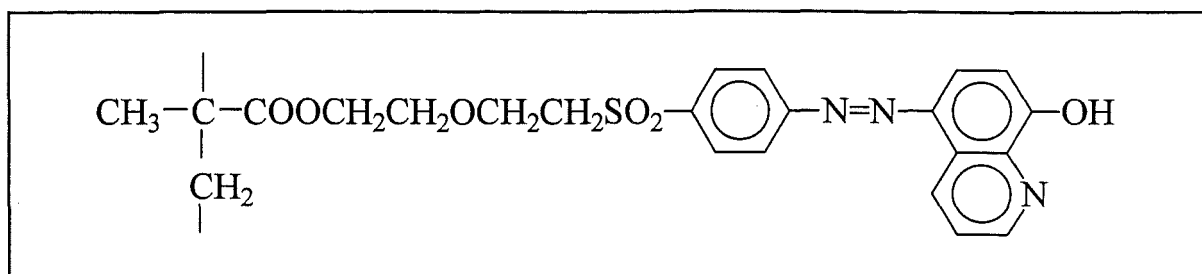


Figura 5. Estructura del grupo funcional quelatante de la resina Spheron Oxine 1000.

Las aplicaciones de esta resina son muy amplias, básicamente se utiliza para la extracción de iones de metales duros. Los iones metálicos cuya adsorción ha sido estudiada con esta resina son: Mn^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , UO_2^{2+} , principalmente. Como ya hemos mencionado anteriormente, muy recientemente, en nuestro laboratorio, se han desarrollado estudios sobre la absorción de Pd (II) sobre esta resina.⁸⁹

Un ion metálico ligado a Spheron Oxine 1000 podría ser utilizado para adsorción selectiva y preconcentración de sustancias orgánicas, ya sea en muestras de control ambiental, en estudios farmacocinéticos o en otros campos de análisis de trazas. Asimismo, esta resina cargada podría utilizarse como empaquetamiento de columnas en cromatografía para absorción de aminoácidos, aminas alifáticas, etc. Este tipo de propiedades es lo que caracteriza la técnica IMAC.

1.4.2. HIS·BIND™ RESIN

His·Bind™ es una resina comercial: Sepharose 6B Fast Flow. Sepharose es un gel derivatizado de la agarosa, la cual, en su estado natural, forma parte de una mezcla compleja de polisacáridos neutros y cargados denominados agar. Para preparar este gel, la agarosa ha sido obtenida por un proceso de purificación que elimina la mayor parte de los polisacáridos cargados para obtener un gel con únicamente un pequeño número de grupos residuales cargados. La denominación 6B se refiere al porcentaje de concentración de agarosa que en este caso es del 6 %. Este gel se forma espontáneamente de una solución caliente de agarosa que se enfría. El polisacárido individual forma cadenas de dobles hélices, las cuales se agregan para formar "bultos" durante la formación del gel estable.

Los intercambiadores iónicos Sepharose® muestran una gran resistencia al ataque microbiano dada la presencia de un inusual azúcar 3,6-anhidro-L-galactosa dentro de su estructura.

Las cadenas de polisacáridos individuales pueden ser representadas como polímeros de la unidad repetitiva que se muestra en la Figura 6.

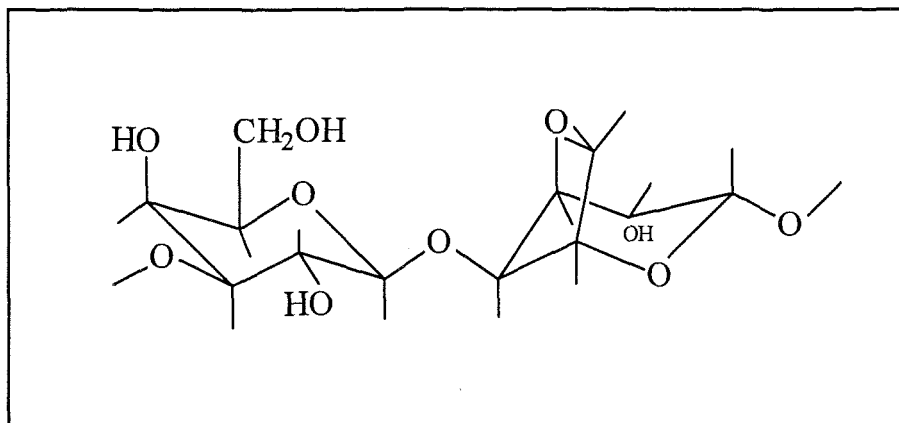


Figura 6. Estructura de la unidad repetitiva de agarosa, donde puede observarse la presencia de un azúcar 3,6-anhidro-L-galactosa.

La estructura entrecruzada de los intercambiadores iónicos Sepharose® muestra una alta estabilidad química y es prácticamente insoluble en todos los disolventes. Es estable en H₂O, disoluciones salinas y disolventes orgánicos en el rango de pH entre 2-14.

Estos intercambiadores iónicos pueden ser utilizados en detergentes no iónicos tales como 8 M de urea y 8 M de cloruro de guanidina.

Bajo condiciones oxidantes pueden producirse una pequeña hidrólisis de las cadenas de polisacárido.

La resina es suministrada como una suspensión en medio etílico (20 %). Se utiliza básicamente para la purificación de proteínas.

1.5. SEPARACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Un procedimiento convencional en la determinación de la estructura de una proteína es el de efectuar la hidrólisis de la misma hasta liberar sus aminoácidos componentes y determinar después la cantidad presente de cada uno de ellos.⁹⁰

Los métodos más ampliamente utilizados hasta la fecha para la separación, identificación y cuantificación de los aminoácidos son, la *electroforesis* y la *cromatografía de intercambio iónico*. Ambos métodos aprovechan las diferencias en el comportamiento ácido-base de los diferentes aminoácidos, o sea las diferencias de signo y la magnitud de sus cargas eléctricas netas a un pH determinado, valores éstos, que pueden predecirse de sus curvas de valoración o bien de sus valores de pK' .

El método más sencillo para separar los aminoácidos es la *electroforesis sobre papel*. Se deposita una gota de disolución de una mezcla de aminoácidos sobre una tira de papel de filtro humedecida con un tampón a un pH determinado y se deja secar. Se aplica un campo eléctrico de alto voltaje a la tira de papel, con lo cual, debido a la diferencia de pK' , los aminoácidos emigran en direcciones y velocidades diferentes dependiendo del pH del sistema tampón y del voltaje aplicado. Los aminoácidos que son cationes a este pH emigrarán hacia el cátodo y los que son aniones emigrarán hacia el ánodo, tal como se indica en el tiempo T_1 y T_2 de la Figura 7.

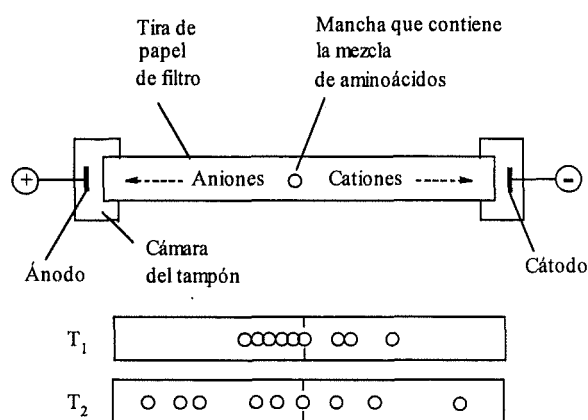


Figura 7. Separación de aminoácidos por electroforesis sobre papel.

Al final del proceso, T_2 , el papel se seca, se espolvoriza con ninhidrina y se calienta, con lo que se revela la posición de los aminoácidos, que pueden identificarse por comparación de aminoácidos utilizados como patrones.

La *cromatografía de intercambio iónico* constituye el método más empleado en la separación, identificación y determinación cuantitativa del contenido de aminoácidos de una muestra.⁹¹ Las resinas de intercambio iónico están preparadas de materiales insolubles tales como agarosa, poliacrilamida, celulosa, etc, conteniendo ligandos cargados negativamente (CH_2COO^- , $\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$) o bien ligandos cargados positivamente ($\text{R-N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)$: dietilamonio), unido covalentemente a la resina insoluble. El grado de retención de una proteína o aminoácido por la resina dependerá de la magnitud de la carga de la proteína a un pH fijado.

Un ejemplo de utilización de cromatografía de intercambio iónico, se muestra en la Figura 8, donde los grupos aniónicos fijos, $-\text{SO}_3^-$, están cargados con Na^+ .

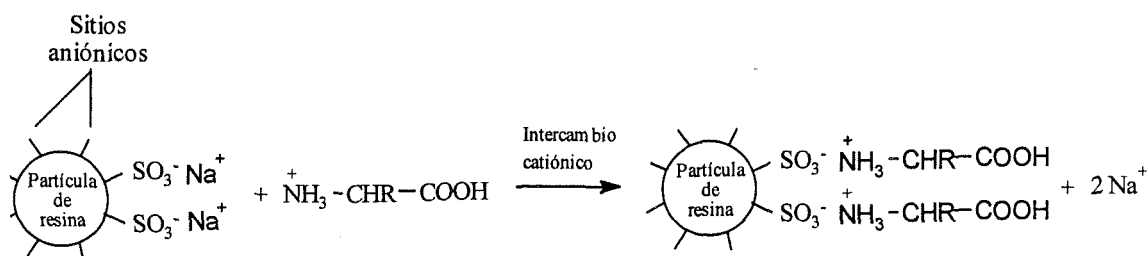


Figura 8. Diferentes formas iónicas de una resina de intercambio catiónico.

Las resinas de intercambio iónico se han utilizado en aplicaciones bioquímicas desde hace décadas. El inicio del uso de las resinas en la separación de aminoácidos puede remontarse a estudios iniciales de Wieland⁹² en 1944, y más concretamente a los trabajos de Winters y Kunin⁹³ en 1949 y a los de Moore y Stein⁹⁴ en 1954. Winters y Kunin emplearon tres resinas de ácido carboxílico en cinco columnas cromatográficas y diferentes condiciones de elución para separar los aminoácidos de una proteína hidrolizada y tres aminoácidos individuales (histidina, arginina y lisina). Debido a su alta capacidad tamponante, esta resina de ácido carboxílico ofrece una ventaja respecto a la resina catiónica fuerte para algunas purificaciones de aminoácidos. Kunin⁹⁵ también utilizó resinas de intercambio iónico de base débil para la recuperación de ácido glutámico y ácido aspártico de una proteína hidrolizada para preparaciones comerciales de aminoácidos (neutros y básicos) como alimento intravenoso. Moore y Stein utilizaron una resina catiónica fuerte, Dowex 50W, cambiando las condiciones de elución en la separación de aminoácidos.

El esquema de la Figura 9, ha sido utilizado comercialmente para la separación de aminoácidos de una proteína hidrolizada.

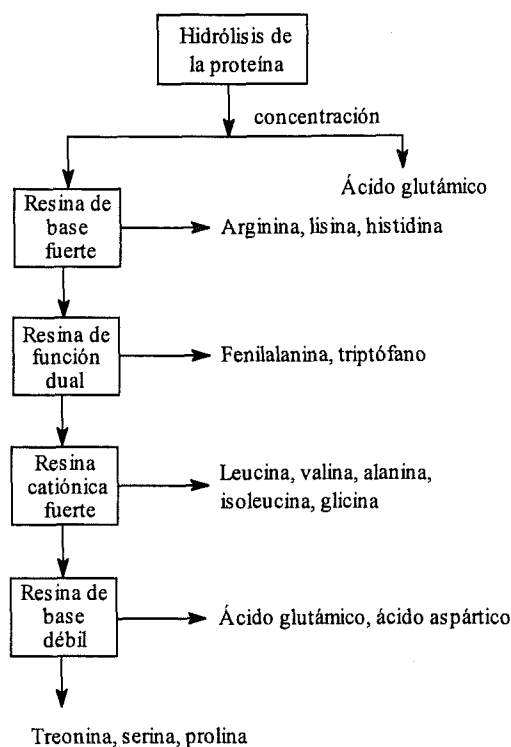


Figura 9. Esquema de la separación de aminoácidos de una proteína hidrolizada por elución cromatográfica.

De acuerdo con este esquema, el pH de disolución resultante de la hidrólisis de una proteína se ajusta con HCl hasta un nivel cercano al punto isoeléctrico del ácido glutámico, permitiendo recuperar aproximadamente unos dos tercios del ácido glutámico por precipitación. La disolución se pasa a través de una resina de base fuerte que adsorbe los aminoácidos básicos. Una resina de funcionalidad dual (una mezcla de resinas catiónicas de base fuerte y débil) se usa posteriormente para adsorber la fenilalanina y el triptófano. La mayoría de los aminoácidos neutros son adsorbidos en la resina catiónica fuerte, mientras que la resina catiónica de base débil adsorbe los aminoácidos ácidos, incluyendo cualquier residuo de ácido glutámico. El cambio de pH de la solución que pasa a través de las diferentes resinas y el pH de las disoluciones de elución que permite la separación cromatográfica de las especies adsorbidas es variable, dependiendo del fabricante.

1.6. AMINOÁCIDOS EN ESTUDIO

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes en las células y constituyen más del cincuenta por ciento del peso seco de las mismas. La estructura de las proteínas la constituye el grupo de moléculas sillaes, relativamente sencillas, a partir de las cuales se construyen las proteínas. Todas las proteínas están construidas a partir del mismo conjunto básico de 20 *aminoácidos*, unidos covalentemente, originando secuencias características. Cada uno de los aminoácidos posee una cadena lateral diferente, lo cual le confiere su individualidad química.

Todos los aminoácidos poseen un átomo de carbono asimétrico, el átomo de carbono α , al que se encuentran unidos cuatro grupos sustituyentes diferentes, un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo R y un átomo de hidrógeno, así pues, el átomo de carbono α , es un centro quiral. La glicina es el único aminoácido que no posee un átomo de carbono asimétrico ya que su grupo R es un átomo de hidrógeno.

La estructura general de los aminoácidos se muestra en la Figura 10.

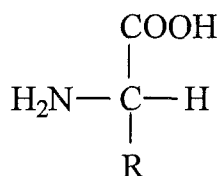


Figura 10. Estructura general de los aminoácidos encontrados en las proteínas, mostrada en forma no iónica.

La configuración absoluta para un aminoácido de muestra en la Figura 11, utilizando la proyección de Fisher donde se muestra la dirección en el espacio de los sustituyentes del carbono α . Tomando como referencia el plano de la página, el α -COOH está direccionado hacia atrás, al igual que el grupo R, mientras que el α -NH₂ y α -H están hacia delante. Por convenio, si el α -NH₂ está proyectado hacia la derecha con respecto al carbono α , el aminoácido tiene la configuración L. Su enantiómero óptico, estará proyectado hacia la izquierda y será denominado D.

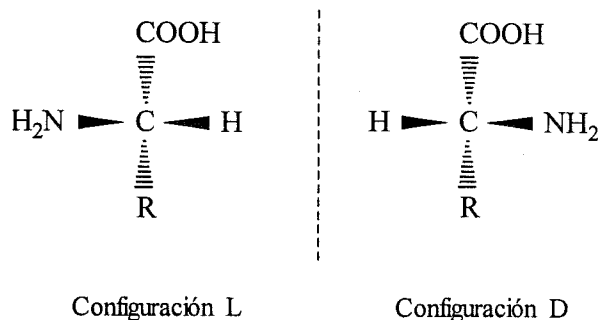


Figura 11. Configuración absoluta de un aminoácido.

Los aminoácidos que se han estudiado en el presente trabajo poseen la configuración L, y éstos son los que han sido estudiados: L-Triptófano, L-Tirosina, L-Fenilalanina y Glicina.

La Figura 12 muestra los aminoácidos en estudio con sus grupos amino y carboxilo ionizados, tal como se hallarían a pH 7,0.

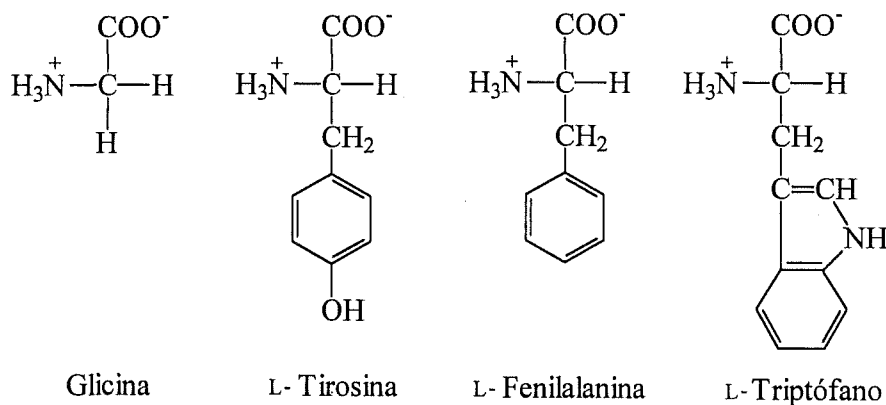


Figura 12. Estructura de los aminoácidos en estudio.

Basándose en las propiedades del grupo R, en particular su polaridad, los aminoácidos se agrupan en cuatro grupos principales, según posean:

1. Grupos R no polares o hidrofóbicos
2. Grupos R polares sin carga
3. Grupos R con carga negativa
4. Grupos R con carga positiva

En nuestro caso, L-Triptófano y L-Fenilalanina, poseen grupos de naturaleza hidrocarbonatada y son, por tanto, hidrofóbicos (grupo 1). L-Tirosina y Glicina, son polares sin carga (grupo 2), ya que poseen grupos R más solubles en agua, es decir, más hidrofílicos que los aminoácidos no polares, ya que pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua. La polaridad de L-Tirosina se debe a su grupo hidroxilo, mientras que en el caso de la Glicina el grupo R es un átomo de hidrógeno y es demasiado pequeño para influir en la elevada polaridad de los grupos α -amino y α -carboxilo.

2. EXPERIMENTAL

2.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Ácido clorhídrico, HCl, Panreac, p.a., España.
- Ácido sulfúrico, H₂SO₄, 96 % riqueza, Panreac, p.a., España.
- Alcohol etílico, CH₃CH₂OH, 96 % pureza, Panreac, p.a., España.
- Cloruro de sodio, NaCl, Panreac, p.a., España.
- Cloruro de paladio (II), PdCl₂, Merck, Alemania.
Se preparó una disolución stock de metal (250 ppm, pH=1) disolviendo una cantidad pesada de PdCl₂ en HCl. La fuerza iónica se mantuvo constante e igual a 0,2 M con NaCl.
- *o*-ftaldialdehído, C₆H₄(CHO)₂, Aldrich, Estados Unidos.
Se preparó una disolución de concentración 10 mg/mL utilizando alcohol etílico como disolvente.
- 2-mercaptoetanol, HSCH₂CH₂OH, 98 % pureza, Aldrich, Inglaterra.
Se preparó una disolución de concentración 5 μL/mL utilizando alcohol etílico como disolvente.
- Dihidrógenofosfato de potasio, KH₂PO₄, Probus, reactivo, España.
Se preparó una disolución tampón de KH₂PO₄ de concentración 0,01 M a pH=6,5.
Debido al carácter ácido del reactivo en disolución, el pH se ajusta con una disolución de NaOH concentrado.
- Hidróxido de sodio, NaOH, 97 % riqueza, Panreac, p.a., España.
- Tetraborato de sodio decahidratado, Na₂B₄O₇·10H₂O, Aldrich, Inglaterra.
Se preparó una disolución tampón de Na₂B₄O₇·10H₂O de concentración 0,05 M y pH=9,0.
- Imidazol, C₃H₄N₂, Fluka, purísimo, Suiza.
Se preparó una disolución 20 mM de Imidazol, 0,16 M KH₂PO₄ a pH=6,5.²²
- Resina Spheron[®] Oxine 1000 (tamaño de partícula 40-30 μm), República Checa.⁸⁵
- Resina His·Bind[™] Resin, Estados Unidos.⁸⁶
- L-Fenilalanina, Phe, Ácido L-Amino-3-fenilpropanoico, C₉H₁₁NO₂, Sigma, grado analítico, Estados Unidos.
- Glicina, Gly, Ácido aminoacético, C₂H₅NO₂·HCl, Sigma, grado analítico, Estados Unidos.
- L-Triptófano, Trp, C₁₁H₁₂N₂O₂, Sigma, grado analítico, Estados Unidos.
- L-Tirosina, Tyr, C₉H₁₁NO₃, Sigma, grado analítico, Estados Unidos.

Se prepararon disoluciones de cada uno de los aminoácidos de concentración 0,01 M, disolviendo una cantidad pesada en tampón KH₂PO₄ 0,01 M a pH=6,5. Así los diferentes aminoácidos se mantienen a pH neutro. Para evitar la degradación de las mismas se conservan en frigorífico a 10°C.

- Reactivo tamponado: Se preparó una disolución mezclando 1,5 mL de la disolución preparada de *o*-ftaldialdehído, 90 mL de la disolución de tampón $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ y 1,5 mL de la disolución preparada de 2-mercaptoetanol.⁹⁶

El reactivo tamponado es estable durante 24 horas en una habitación termostatzada a 25°C.

2.2. INSTRUMENTACIÓN

La determinación de la concentración de Pd (II) en las diferentes disoluciones acuosas se realizó mediante Espectroscopia de emisión atómica en plasma inducido (ICP-AES) para lo que se utilizó un Espectrómetro ICP-AES, ARL modelo 3410 (minitorch), (Estados Unidos).

Para el análisis de los diferentes aminoácidos se utilizó un Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer modelo 544, (Estados Unidos).

En el caso del aminoácido Glicina se utilizó un Espectrofotómetro de Fluorescencia Hitachi modelo F-4500, (Alemania).

En los experimentos tanto de inmovilización de Pd (II), como de adsorción y elución de aminoácidos se empleó un agitador rotatorio SBS modelo ABT-3, (España).

Finalmente, las medidas de pH se realizaron utilizando un electrodo de vidrio Ingold, modelo 100505, conectado a un pHmetro, Crison modelo 507, (España).

2.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

A continuación se describen los métodos analíticos utilizados en la determinación de los diversos componentes de las disoluciones y las resinas en estudio.

2.3.1. DETERMINACIÓN DE Pd (II) EN LAS DISOLUCIONES ACUOSAS

La determinación de Pd (II) en las distintas disoluciones acuosas utilizadas en el presente estudio se llevó a cabo mediante la técnica de Espectroscopia de Emisión Atómica en Plasma de Acoplamiento Inducido (ICP-AES). Las características de la determinación se fijaron como:

$\lambda = 340,96 \text{ nm}$

Límite de detección: 0,05 ppm

La utilización de ICP-AES para determinar Pd (II) está justificada por dos razones fundamentales: las condiciones de la disolución (bajos niveles de contenido de Pd (II) y concentración salina elevada), y el número de muestras a analizar consecuencia de las determinaciones necesarias para el estudio.

2.3.2. ANÁLISIS ESPECTROFLUORIMÉTRICO DE AMINOÁCIDOS

Hasta los trabajos realizados por M. Roth en 1971,⁹⁶ el reactivo más utilizado para la determinación de α -aminoácidos era la ninhidrina. Sin embargo, para determinados propósitos, sobretudo en bioquímica, es necesaria una determinación mucho más sensible que la detección absorciométrica, que provoca el método clásico de la ninhidrina.

Hillmann⁹⁷ investigó sobre la posibilidad del uso de *o*-diacetilbenceno como agente fluorógeno para las proteínas. Posteriores trabajos de M. Roth, demostraron que empleando *o*-ftaldialdehído (OPA) en lugar de *o*-diacetilbenceno, se obtenían mejores resultados.

El método de determinación se basa en la reacción de OPA con un aminoácido en presencia de un agente reductor fuerte como 2-mercaptoetanol o borhidruro de potasio.

Efecto del pH:

Los aminoácidos que contienen grupos alifáticos, ácidos, sulfuro o hidróxido, presentan máxima fluorescencia en su reacción con OPA cuando la reacción tiene lugar a valores de pH de 8,0-11,0. Excepto la Lisina, la cual presenta máxima fluorescencia en el rango de pH de 6,0-7,0. Así pues, la fluorescencia de los aminoácidos es máxima si esta reacción con OPA y 2-mercaptoetanol tiene lugar en un medio tamponado con tetraborato (a excepción dicha del caso de la Lisina).

Influencia del tiempo:

A temperatura controlada de 25°C la reacción tiene lugar rápidamente. La máxima intensidad de fluorescencia tiene lugar entre los 5 y los 10 minutos después de mezclar los reactivos. Se observa una lenta disminución de la intensidad de fluorescencia, aunque la estabilidad es suficiente como para permitir realizar medidas entre los 5 y los 25 min después de que se haya producido la reacción.

La ventaja sobre la reacción de la ninhidrina es la sensibilidad,⁸ la cual se incrementa en un factor de 50 con el método de OPA. Otra ventaja es que el producto fluorescente se forma rápidamente, haciendo innecesarios las extensas columnas de calentamiento utilizadas en la detección de ninhidrina, además de que con OPA se pueden determinar todos los aminoácidos comunes, excepto la cisteína y los iminoácidos de prolina y hidroxiprolina. Por otro lado el método de la ninhidrina provoca una débil fluorescencia para los aminoácidos que poseen grupos alifáticos.

2.3.3. DETERMINACIÓN DE CLORURO

Después del proceso de adsorción de Pd (II), se determinó el contenido de Cl⁻ en la resina Spheron Oxine 1000 de dos formas distintas que a continuación se describen.

2.3.3.1. Análisis potenciométrico

La determinación del contenido de Cl⁻ adsorbido en la resina tras el proceso de adsorción de Pd (II) se realiza por análisis potenciométrico de las muestras.

Un cierto volumen de (15 a 50 mL) de disolución de Pd (II) de concentración 250 ppm, fue añadido a una columna cromatográfica, conteniendo una cantidad variable (20 mg a 500 mg) de resina Spheron Oxine 1000. Las muestras se agitan durante 30 min, la resina se separa por filtración de la disolución acuosa y dicha disolución se analiza potenciométricamente.

El análisis se lleva a cabo utilizando un electrodo de vidrio como electrodo de referencia y un electrodo selectivo para iones cloruro tal como el que proporciona el sistema Ag/AgCl, formado por un hilo de plata sumergido en una disolución saturada de KCl 1 M. Los dos electrodos están conectados a dos potenciómetros (resolución $\pm 0,1$ mV y $\pm 0,001$ de pH). De esta forma los valores de potencial para cada una de las muestras se interpolan en una recta de calibrado realizada previamente, obteniéndose el valor de concentración correspondiente.

2.3.3.2. Análisis elemental sobre el sólido (método del frasco de oxígeno de Schöniger)

El procedimiento⁹⁸ consiste en pesar exactamente alrededor de 5-10 mg de muestra en una pieza de papel con una forma característica, ya que se dobla dejándose la "cola" o mecha, libre. Este papel se coloca en una cesta de platino que se encuentra suspendida desde la base de un tapón de vidrio de un frasco de 500 mL o 1L. El frasco, que contiene unos mililitros de disolución absorbente (p.ej. disolución acuosa de hidróxido de sodio), se llena de oxígeno y se sella mediante el tapón que contiene la mencionada cesta de platino. La mecha de la "bolsa" de papel se enciende antes de colocar el tapón en el cuello del frasco, o mejor todavía por combustión por control remoto eléctrico o mediante una lámpara de infrarrojo. En cualquier caso, la combustión es rápida y usualmente se completa entre 5 y 10 segundos. Tras esperar unos minutos, hasta que la combustión ha finalizado, el frasco se agita durante unos 2-3 minutos para asegurar una absorción completa. El contenido de Cl⁻ en la disolución se determina finalmente mediante valoración potenciométrica con nitrato de plata.

2.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental incluye fundamentalmente tres etapas:

2.4.1. Inmovilización del ion metálico en la resina

2.4.2. Adsorción del aminoácido en la resina cargada con el ion metálico

2.4.3. Elución del aminoácido

2.4.1. INMOVILIZACIÓN DEL ION METÁLICO EN LA RESINA

Para determinar la capacidad de la resina, se pesa una cantidad de resina que se coloca en el interior de una columna cromatográfica Econocolumn BioRad.⁹⁹ Seguidamente, cada columna conteniendo la resina correspondiente se pone en contacto con un volumen de disolución de PdCl₂ de diferente concentración, obtenidas por dilución de una disolución stock de 250 ppm, dichas columnas se colocan en un agitador rotatorio durante un tiempo comprendido entre los 30-120 min. Finalmente se recogen muestras de las columnas y se determina la concentración de Pd (II) remanente en disolución por análisis en ICP. De la diferencia entre el Pd (II) inicial y el analizado obtenemos la concentración de Pd (II) inmovilizado en la resina.

Una vez se ha cargado la resina con el metal y se ha determinado la cantidad de Pd (II) adsorbido (determinación de la capacidad de la resina), se pasa a estudiar la capacidad de adsorción de los diferentes aminoácidos sobre la resina que contiene el Pd (II) inmovilizado.

Antes de esta segunda etapa experimental cabe resaltar que se debe limpiar la resina de la probable cantidad de Pd (II) adsorbido físicamente sobre ella o que puede quedar adherida a las paredes de las columnas. De esta forma, se realizan tres lavados con 10 mL de KH₂PO₄ 0,01 M a pH=6,5, comprobando que, después de cada lavado, no existe cantidad apreciable de Pd (II) a la salida de la columna, comprobación que se realiza del contenido de Pd (II) en las aguas de lavado mediante determinación por ICP.

2.4.2. ADSORCIÓN DEL AMINOÁCIDO EN LA RESINA

Diferentes columnas con resina portadora de Pd (II), fueron tratadas con disoluciones de aminoácido en medio tamponado de KH₂PO₄ 0,01 M a pH=6,5.

El procedimiento seguido fue muy similar al de la etapa 2.4.1. De esta forma, sobre diferentes columnas conteniendo la máxima carga de Pd (II), y una vez lavadas, se ponen en contacto con 10

mL de disoluciones de diferente concentración de un determinado aminoácido. El rango de concentraciones de aminoácido fue de 10^{-5} - 10^{-2} M.

Seguidamente se colocan las columnas en un agitador rotatorio manteniéndolas en agitación durante aproximadamente 12 h, asegurando de esta forma la obtención del equilibrio de adsorción. Posteriormente se recogen muestras de la disolución de aminoácido y se determina su contenido por espectrofotometría UV-Vis o bien por espectrofluorimetría, dependiendo del aminoácido a analizar.

El procedimiento de análisis fluorimétrico⁹⁶ se describe a continuación:

Incrementando cantidades desde 10 a 100 μ L de una disolución $2,5 \cdot 10^{-4}$ M de aminoácido, se pusieron en contacto con 3 mL de una disolución recién preparada de reactivo tamponado (1,5 mL de OPA, 90 mL de Tampón Borato, 1,5 mL de 2-Mercaptoetanol, como se describió anteriormente). Dado que la cinética de la reacción con OPA determina la señal fluorimétrica, después de la mezcla, se deja que la reacción proceda durante un tiempo exacto de 8 min 30 s, ya que bajo nuestras condiciones es el tiempo para el cual se determina la máxima intensidad de fluorescencia para todos los aminoácidos en estudio. De esta forma se obtuvo la recta de calibrado en el margen de concentraciones señalado.

Las muestras, extraídas de la columna, se diluyen y se hacen reaccionar con el reactivo tamponado. A continuación se determina la concentración de aminoácido por interpolación de la intensidad de fluorescencia medida en la curva de calibrado.

2.4.3. ELUCIÓN DEL AMINOÁCIDO

El tercer paso del procedimiento experimental consiste en la elución del aminoácido adsorbido. De manera similar a la etapa anterior, se realizan tres lavados con 10 mL de KH_2PO_4 0,01 M ya que este fue el medio en el que se realizó la adsorción, de esta forma no cambiamos el pH del medio.

Así, se consigue que el aminoácido que eluyamos posteriormente sea prácticamente el ligado al metal y no el que puede quedar adsorbido sobre la superficie de la resina o el que queda impregnando las paredes de la columna. Este proceso es similar al que efectuábamos tras la carga de Pd (II) sobre la resina.

Una vez tenemos la resina limpia de aminoácido no adsorbido físicamente, se introducen en la columna 10 mL de disolución eluyente, para ello se utilizaron soluciones de HCl y H_2SO_4 cuyo valor de pH estaba comprendido entre 0 y 5. Para la elución de Glicina se utilizó además una disolución de Imidazol 20 mM a pH=6,5.

Tras un tiempo de agitación de 2 h se vaciaron las columnas comprobando el pH a la salida de las mismas. Las muestras se analizaron espectrofotométricamente o por fluorimetría de la misma forma que se describió anteriormente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados obtenidos en cada una de las etapas del procedimiento utilizando la técnica IMAC y se discuten resaltando los fundamentos químicos y termodinámicos del comportamiento observado.

3.1. INMOVILIZACIÓN DE Pd (II) SOBRE LAS RESINAS DESCRITAS

3.1.1. INMOVILIZACIÓN DE Pd (II) SOBRE HBR

La inmovilización de Pd (II) sobre el soporte polimérico se llevó a cabo mediante el tratamiento discontinuo en columnas con una disolución de PdCl₂ (pH=1, I= 0,2 M en Cl⁻) de la resina HBR.

Con este objetivo se realizaron, de forma sistemática, una serie de experimentos donde se determinó la cantidad de Pd (II) que era adsorbido por una cantidad constante de resina para diferentes concentraciones iniciales de metal en la fase acuosa.

La cantidad de resina se mantuvo constante e igual a 250 µL, que corresponde en peso a 6,25 mg. Esta cantidad de resina se puso en contacto con 10ml de disolución de Pd (II) a pH=1 y fuerza iónica constante e igual a 0,2 M, la concentración inicial de Pd (II) en la fase acuosa se varió entre 3 y 100 ppm. Las columnas eran agitadas durante 2 h en un agitador rotatorio. Los valores obtenidos mediante análisis por ICP se recogen en la Tabla I y se hallan representados en la Figura 13. Los valores se dan con una imprecisión de $\pm 10^{-7}$ mmoles Pd (II) y $\pm 10^{-4}$ mmoles Pd (II)_{ads}/g resina, respectivamente.

Tabla I. Resultados obtenidos de la inmovilización de Pd (II) sobre HBR.

mmoles Pd (II) _{inic} x 10 ⁴	mmoles Pd (II) _{ads} /g resina
3,51	0,044
6,45	0,093
12,28	0,195
23,78	0,259
48,90	0,253
72,80	0,259
99,60	0,259

A la vista de los resultados se observa que a valores cercanos a 0,002 mmoles de Pd (II) inicial, la adsorción por parte de la resina llega a un valor de saturación que corresponde a 0,259 mmoles de Pd (II)/ g resina HBR. Esta cantidad corresponde a la máxima capacidad de la resina HBR de adsorber Pd (II), bajo las condiciones descritas. Los valores se dan con una imprecisión de $\pm 10^{-7}$ mmoles Pd (II) y $\pm 10^{-4}$ mmoles Pd (II)_{ads}/g resina, respectivamente.

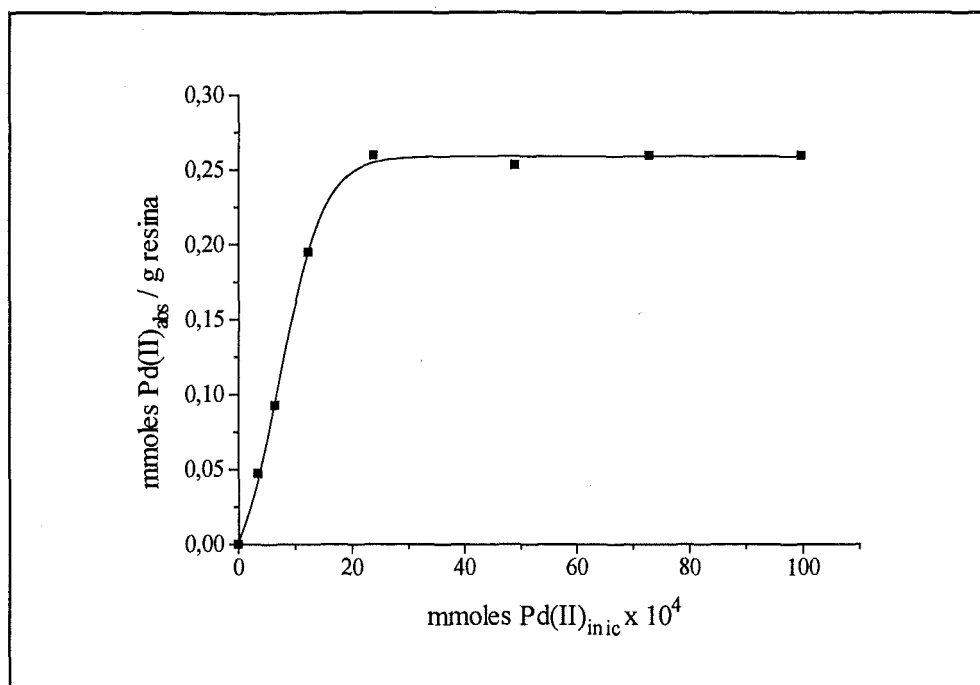


Figura 13. Resultados obtenidos, bajo las condiciones indicadas en el texto, en la adsorción de Pd (II) por HBR.

3.1.2. INMOVILIZACIÓN DE Pd (II) SOBRE SPHERON OXINE 1000

En el caso de la resina Spheron Oxine 1000 el procedimiento fue idéntico al anterior, manteniéndose, en este caso, la cantidad de resina a un valor de 30 mg.

La concentración inicial de Pd (II) en la fase acuosa se varió entre 5 y 250 ppm. Al igual que en el caso anterior, las columnas eran agitadas 2 h. Los valores obtenidos se recogen en la Tabla II y están representados en la Figura 14.

Tabla II. Resultados obtenidos de la inmovilización de Pd (II) sobre Spheron Oxine 1000.

mmoles Pd (II)_{inic} x 10⁴	mmoles Pd (II)_{ads}/g resina
24,33	0,081
47,91	0,159
73,02	0,243
97,02	0,323
110,16	0,359
125,13	0,407
137,43	0,456
157,83	0,516
169,74	0,563
189,06	0,584
243,36	0,646
369,99	0,644
1183,41	0,655

Los resultados obtenidos muestran una adsorción creciente de Pd (II) por la resina Spheron Oxine 1000 hasta llegar a un valor de 0,655 mmoles/g resina.

Los resultados obtenidos mediante análisis elemental de nitrógeno nos dió un valor de 0,680 mmoles/g resina, con lo cual la capacidad de adsorción de Pd (II) obtenida está muy próxima a este valor teórico. Por otro lado, si comparamos con la adsorción obtenida anteriormente con HBR, en este caso se ha incrementado sustancialmente, de aquí que tuviéramos que incrementar el valor del total de Pd (II) hasta 1180×10^{-4} mmoles de Pd (II).

Las diferencias observadas entre HBR y Spheron Oxine 1000 se deben principalmente a la mayor afinidad por el Pd (II) del grupo quelatante 8-hidroxiquinoleína con respecto a los grupos hidroxilo de la HBR.

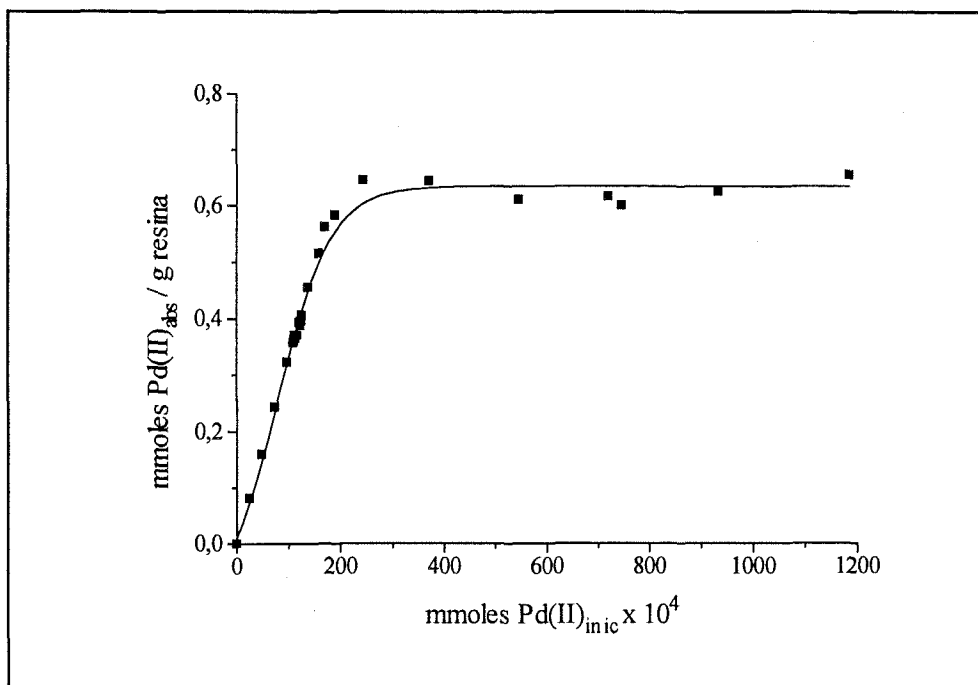


Figura 14. Resultados obtenidos en la adsorción de Pd (II) por Spheron Oxine 1000.

Así pues, para el caso de la HBR la capacidad se determinó como:

$$0,259 \text{ mmols Pd (II) / g resina}$$

En cambio, para Spheron Oxine 1000, la capacidad de adsorción tiene un valor de:

$$0,655 \text{ mmols Pd (II) / g resina}$$

Se observa que la capacidad de adsorción para Pd (II) de la resina Spheron Oxine 1000 es más de dos veces superior a la HBR.

A la vista de los resultados se descartó seguir trabajando con la HBR, con lo cual las sucesivas experiencias de adsorción de aminoácidos se llevaron a cabo utilizando únicamente la resina portadora del grupo 8-hidroxiquinoleína, es decir la Spheron Oxine 1000.

3.2. ESTUDIO TERMODINÁMICO DE LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN DE Pd (II) POR SPHERON OXINE 1000

Tanto los procesos de adsorción como los de elución están directamente afectados por diferentes parámetros químicos relativos a la formación del complejo entre Pd (II) y Oxina. Teniendo en cuenta este hecho realizaremos una caracterización termodinámica de estos procesos, lo que nos permitirá explicar los datos obtenidos tanto de adsorción como de elución y predecir las condiciones óptimas de trabajo.

El método para conseguir esta finalidad se basa en el análisis de los datos de equilibrio sólido-líquido mediante cálculo numérico de modelos de comportamiento. Dichos cálculos se han llevado a cabo utilizando el programa SED (Simple Equilibrium Diagrams).¹⁰⁰ Las constantes de estabilidad de los componentes del sistema han sido críticamente revisadas¹⁰¹ y los datos utilizados han sido extraídos de la literatura.^{102,103}

A continuación se describen los estudios realizados sobre reacciones resina-Pd (II) a través de un modelo en fase homogénea que será posteriormente extrapolado al sistema sólido-líquido.

3.2.1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA EN FASE HOMOGÉNEA

Como se mencionó anteriormente el grupo funcional quelatante en la resina Spheron Oxine 1000 es 8-hidroxiquinoleína, es decir el grupo Oxina.

Este grupo Oxina tiene un nitrógeno básico y un grupo hidroxilo fenólico con lo cual puede formar un anillo de cinco átomos al formar un quelato con un ion metálico. Los complejos que resultan de la formación de este quelato son bastante estables observándose un aumento de la estabilidad del quelato con iones de elementos de transición en los que la configuración electrónica de este ion metálico pueda ser totalmente ocupada.¹⁰⁴

Por otro lado, el máximo estado de oxidación que puede alcanzar el paladio es +4, siendo el ion bivalente Pd (II) el más estable, con lo que los complejos de Pd (IV) son bastante escasos. Incluso en el caso de PdCl_6^{2-} , el más conocido de los complejos de Pd (IV), éste se reduce rápidamente a Pd (II).

Algunos ejemplos de la estabilidad de los complejos de Pd (II)-Oxina pueden encontrarse en la bibliografía,¹⁰⁵ observándose que las condiciones óptimas de pH para la formación del complejo corresponden a una disolución clorhídrica diluida.

En la Figura 15 se muestra el diagrama de áreas de predominio para las especies de Pd (II) en función de la concentración de Cl⁻ y del pH.¹⁰⁶

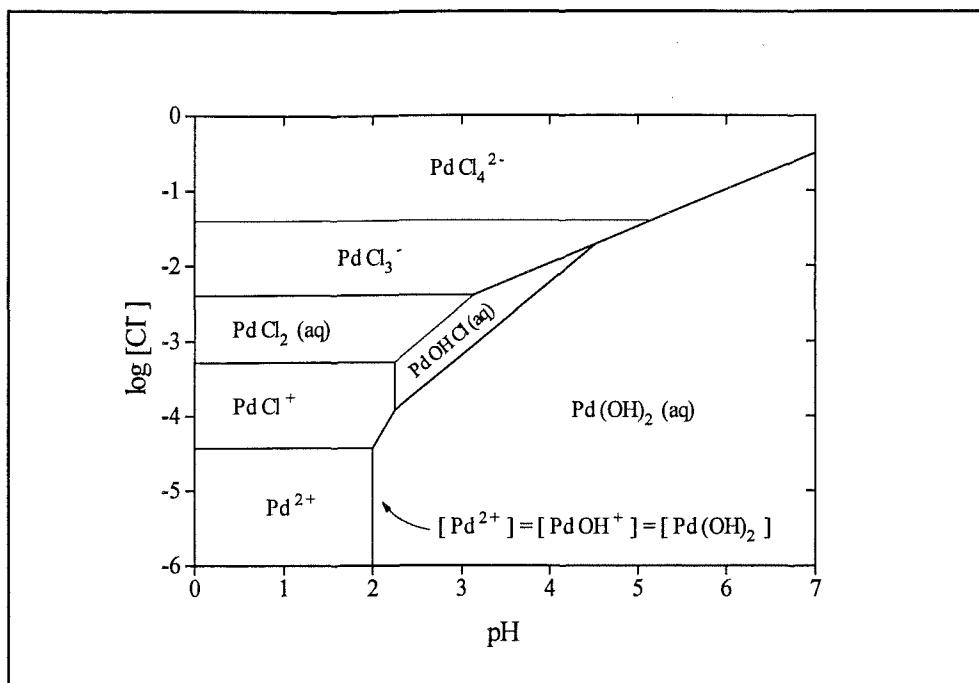


Figura 15. Diagrama de áreas de predominio para el sistema Pd (II)-Cl⁻ en función del pH.

Se observa que, a concentraciones relativamente elevadas de Cl⁻ (superiores a 0,1M), la especie PdCl₄²⁻ es la predominante en todo el rango de pH. En nuestro caso la especie PdCl₄²⁻ es la predominante, ya que la concentración de cloruro se mantuvo constante a 0,2 M con NaCl.

También, es importante considerar el comportamiento ácido-base de la oxina, en este sentido, las especies en equilibrio ácido-base de la oxina en función del pH se muestran en el diagrama de distribución de la Figura 16. De este diagrama se puede deducir que a valores bajos de pH (inferiores a 2,5), únicamente la especie H₂(Oxn)⁺ está presente en el sistema y a valores altos de pH, es la especie (Oxn)⁻. Un compuesto neutro H(Oxn) aparece a pH próximo a 2,5 y adquiere un valor máximo a valores de pH cercanos a 7.

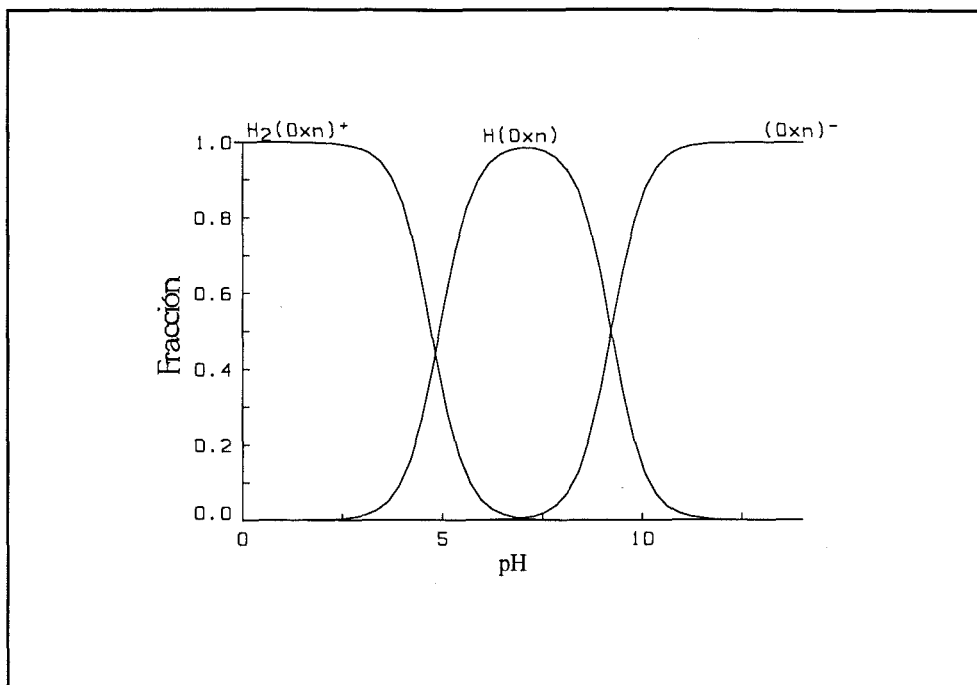


Figura 16. Diagrama de distribución de especies de la 8-hidroxiquinoleína (Oxina) en función del pH.

En nuestro caso, el pH lo mantenemos constante e igual a 1, para evitar la formación de hidroxocomplejos insolubles del paladio y asegurar que éste está en la forma de complejo $PdCl_4^{2-}$. En estas condiciones, el grupo oxina estará en estado protonado, que dada la estabilidad del quelato, coordinará con Pd (II) para formar el complejo correspondiente.

Estas condiciones de complejación favorecen la selectividad de la reacción, ya que a valores de pH tan bajos los complejos de oxina con otros iones metálicos no son tan estables.

Si el sistema está compuesto por Pd (II), oxina y Cl⁻, las especies que se forman serán: PdCl₂(Oxn)⁻, Pd(Oxn)₂, PdCl₄²⁻, Pd(OH)₂ y H₂(Oxn)⁺.

Las especies en equilibrio de este sistema se muestran en la Figura 17 que se recoge en el diagrama de distribución correspondiente.

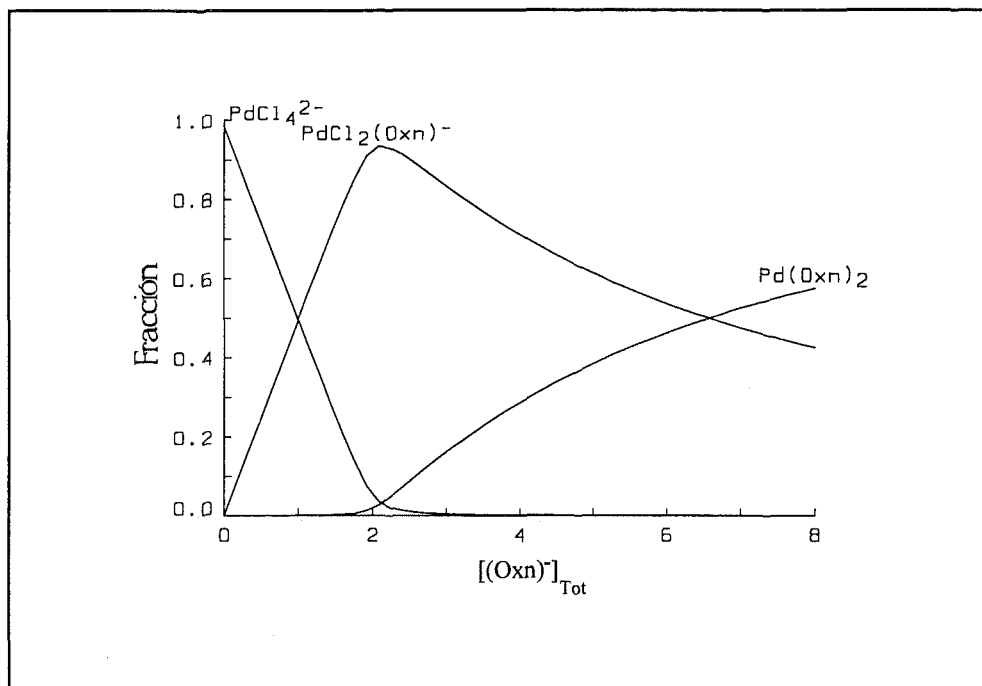
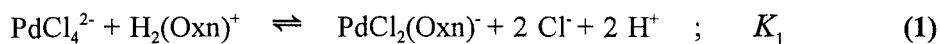


Figura 17. Diagrama de distribución de las especies del sistema Pd (II), Cl⁻ y Oxina. ([Pd (II)]=2 mM, [Cl⁻]=200 mM y pH=1) .

En el diagrama se observa, como cabía esperar, que el contenido del complejo PdCl₂(Oxn)⁻ adquiere un valor máximo cuando la concentración de oxina es de aproximadamente 2 mM. Este hecho nos puede indicar las condiciones óptimas de carga para el Pd (II) sobre la resina.

La reacción de formación del complejo Pd-Oxina puede ser representada por la ecuación:



Teniendo en cuenta que la concentración de Cl^- y la acidez se mantienen constantes durante el proceso de complejación, la constante de equilibrio se puede escribir como sigue:

$$K = \frac{[\text{PdCl}_2(\text{Oxn})^-] [\text{Cl}^-]^2 [\text{H}^+]^2}{[\text{PdCl}_4^{2-}] [\text{H}_2(\text{Oxn})^+]} = \frac{K_1}{[\text{H}^+]^2 [\text{Cl}^-]^2} \quad (2)$$

Por balance de masas tenemos que,

$$[\text{H}_2(\text{Oxn})^+]_{\text{tot}} = [\text{PdCl}_2(\text{Oxn})^-] + [\text{H}_2(\text{Oxn})^+] \quad (3)$$

Substituyendo en la ecuación (2), nos queda

$$K = \frac{[\text{PdCl}_2(\text{Oxn})^-]}{[\text{PdCl}_4^{2-}] ([\text{H}_2(\text{Oxn})^+]_{\text{tot}} - [\text{PdCl}_2(\text{Oxn})^-])} \quad (4)$$

donde,

$[\text{PdCl}_4^{2-}]$: concentración de ion paladio

$[\text{H}_2(\text{Oxn})^+]_{\text{tot}}$: concentración total de grupos oxina por gramo de resina

Operando la ecuación (4), la inversa nos dará,

$$\frac{1}{K} = \frac{([\text{PdCl}_4^{2-}] [\text{H}_2(\text{Oxn})^+]_{\text{tot}}) - ([\text{PdCl}_4^{2-}] [\text{PdCl}_2(\text{Oxn})^-])}{[\text{PdCl}_2(\text{Oxn})^-]} \quad (5)$$

reordenando la ecuación (5) obtenemos,

$$\frac{1}{K} + [\text{PdCl}_4^{2-}] = \frac{[\text{PdCl}_4^{2-}] [\text{H}_2(\text{Oxn})^+]_{\text{tot}}}{[\text{PdCl}_2(\text{Oxn})^-]} \quad (6)$$

para finalmente obtener la ecuación (7),

$$\frac{[PdCl_4^{2-}]}{[PdCl_2(Oxn)^-]} = [PdCl_4^{2-}] \frac{1}{[H_2(Oxn)^+]_{tot}} + \frac{1}{K [H_2(Oxn)^+]_{tot}} \quad (7)$$

Representando gráficamente $\frac{[PdCl_4^{2-}]}{[PdCl_2(Oxn)^-]}$ frente a $[PdCl_4^{2-}]$ obtenemos una recta con

pendiente $\frac{1}{[H_2(Oxn)^+]_{tot}}$ y ordenada en el origen $\frac{1}{K [H_2(Oxn)^+]_{tot}}$.

De hecho, el término izquierdo de la ecuación (7) es la recíproca de la función de distribución (D), que se define como la fracción de Pd (II) en la resina y en la fase acuosa.

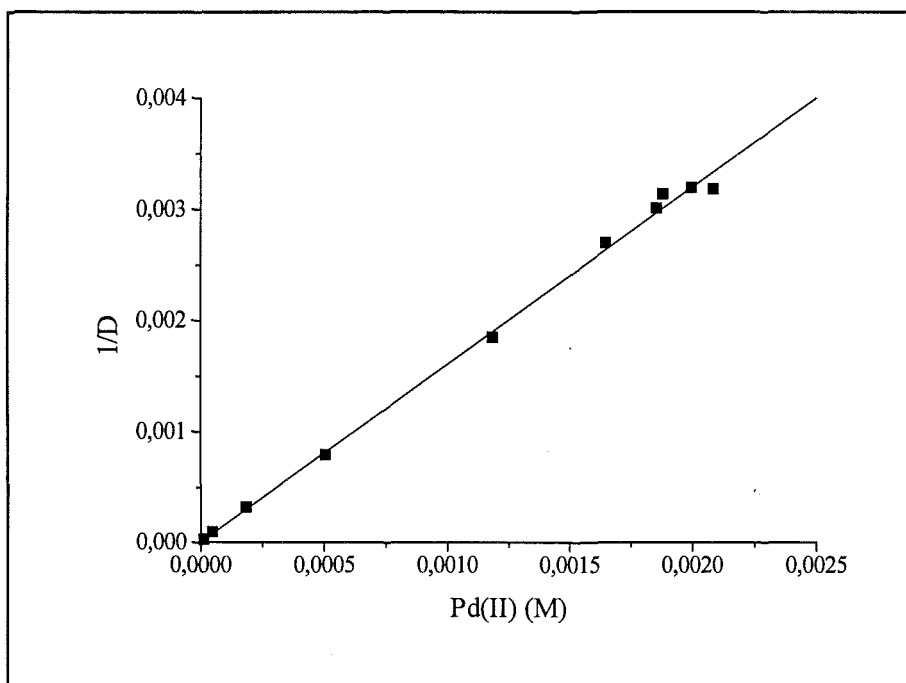


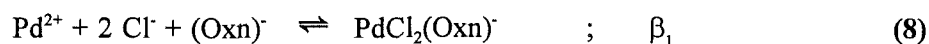
Figura 18. Representación de la inversa de la función de distribución frente a la concentración de Pd (II).

En la Figura 18 se observa una buena relación lineal de los datos experimentales, lo que valida el modelo propuesto en la reacción de formación.

A partir de la relación de la ecuación (7), se determinó el valor de la constante de estabilidad, K, para el complejo $PdCl_2(Oxn)^-$ como $\log K=5,36$.

Teniendo en cuenta las condiciones bajo las cuales se ha determinado esta constante el valor es:
 $\log K_1 = 1,96$.

También es posible determinar la constante de formación global de la reacción:



este valor viene determinado a partir de las ecuaciones:



por lo que,

$$\log \beta_1 = \log K + 2 \log [\text{Cl}^-] - 2 \text{pH} + \log \beta_{\text{PdCl}_4^{2-}} + \log \beta_{\text{H}_2(\text{Oxn})^+} \quad (11)$$

con lo cual, finalmente el valor de $\log \beta_1$ es:

$$\log \beta_1 = 31,81$$

Dada la formación de complejos Pd (II)-Cl⁻, y dado que el medio utilizado en este estudio es 0,2 M en Cl⁻, trataremos de determinar la influencia del Cl⁻ en la adsorción de Pd (II) en la resina.

3.2.2. ESTUDIO DEL CONTENIDO EN CLORURO EN LA ADSORCIÓN DE Pd (II)

Como se comentó anteriormente, el Pd (II), en disoluciones con alto contenido en Cl⁻, se encuentra como PdCl₄²⁻ adoptando preferentemente la geometría plano cuadrada, encontrándose, en este caso, coordinado por cuatro Cl⁻. Es previsible suponer que cada grupo funcional de Spheron Oxine 1000 ocupará el lugar de dos Cl⁻, ya que puede coordinar por los átomos de nitrógeno y oxígeno. Así, la estequiometría del complejo Pd (II)-Oxina 1:1 cabría esperarse como PdCl₂Oxn⁻.

Con el objeto de verificar este comportamiento, hemos realizado una serie de experimentos que determinan la cantidad de Cl^- presente en la resina cargada. Estos experimentos se han llevado a cabo mediante dos técnicas distintas lo que nos permite validar de una forma más objetiva los resultados obtenidos.

El análisis del contenido de Cl^- se llevó a cabo por dos métodos:

Método indirecto, basado en el análisis potenciométrico del Cl^- liberado en la complejación de Pd (II), y el *Método directo*, basado en el análisis elemental.

En la Figura 19 se muestran los resultados del análisis potenciométrico, donde se representa el contenido de Cl^- unido al Pd (II) inmovilizado en la resina frente al Pd (II) inmovilizado.

Cuando la relación Pd (II)/Resina, o lo que es lo mismo Pd (II)/Oxina, es baja, obviamente el contenido de Cl^- unido a la resina es también muy bajo, ya que en estas condiciones, los cuatro grupos cloruro son reemplazados por dos grupos oxina, con lo cual queda claro que el contenido de cloruro unido al Pd (II) sea prácticamente nulo. Al aumentar la relación Pd (II)/Resina, el contenido de cloruro también aumenta gradualmente. Este aumento se detiene cuando la relación Pd (II)/Resina adquiere aproximadamente el valor de 0,8.

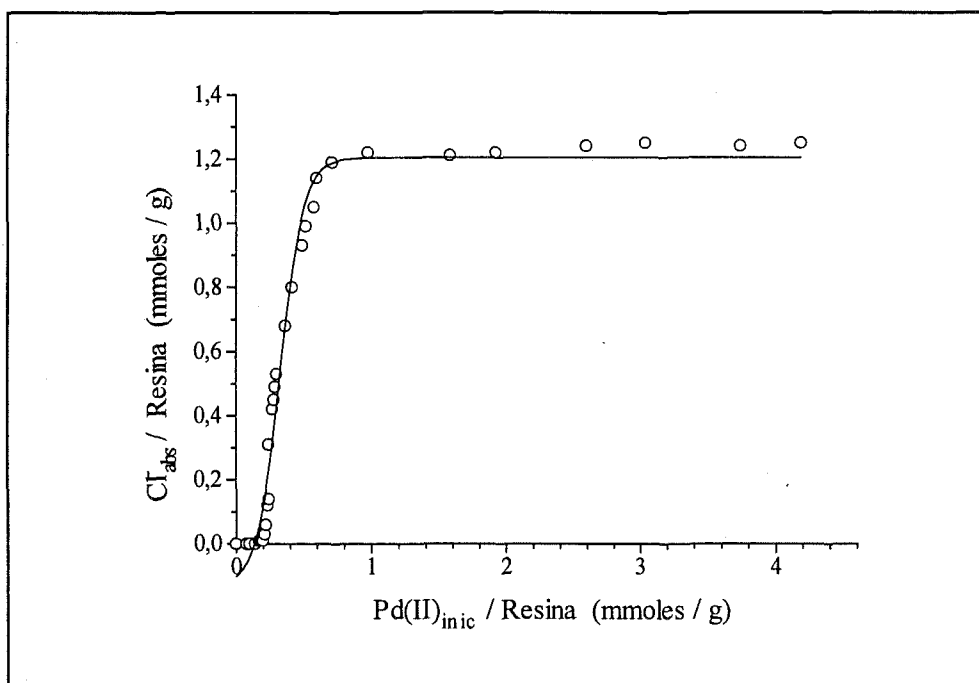


Figura 19. Representación del contenido en cloruro del Pd (II) inmovilizado.

Si nos basamos en los datos experimentales, la capacidad de la resina es de 0,655 mmoles Pd (II) adsorbidos por gramo de resina y, dado que el valor obtenido del contenido de Cl^- adsorbido en la etapa de complejación es de 1,2 mmoles adsorbidos por gramo de resina, es decir, el doble del valor máximo para el caso de Pd (II), podemos deducir que, bajo estas condiciones, las especies de

estequiometría 1:1 son predominantes en solución a las de estequiometría 1:2. Con lo cual es fácilmente explicable el hecho de que efectivamente un grupo oxina ocupe dos de los cuatro puntos de coordinación donde estaba unido el Cl^- al Pd (II). Así pues, podemos expresar la estructura del complejo de estequiometría 1:1 como el complejo $\text{PdCl}_2(\text{Oxn})^-$.

La Figura 20 compara los contenidos de Cl^- obtenidos por el análisis elemental y los realizados mediante el análisis potenciométrico. Los valores de obtenidos en el análisis potenciométrico son superiores a los que ofrece el análisis elemental del sólido.

Las diferencias observadas entre uno u otro análisis pueden ser explicadas mediante el *efecto de exclusión de Donnan*.¹⁰⁷ Este efecto ocurre cuando un intercambiador de iones se coloca en una disolución con un electrólito, en cuyo caso puede ocurrir que el electrólito (en nuestro caso, $\text{H}^+ \text{Cl}^-$) se introduzca por difusión en el interior de la matriz polimérica y por tanto la concentración de iones Cl^- en disolución disminuya ligeramente.

En el caso del análisis potenciométrico, como se describió en las técnicas analíticas, medimos el potencial de la disolución de la muestra que estuvo en contacto con la resina. Si se produce este efecto, en realidad, estaremos midiendo una concentración de Cl^- inferior a la "real". Debido a que el cálculo del contenido de Cl^- se realiza por diferencia entre este valor y el inicial, finalmente obtenemos un valor de Cl^- adsorbido superior al real.

Por contra, el análisis elemental del sólido nos ofrece un valor real del Cl^- adsorbido en la resina, ya que este se produce por análisis de la resina seca, en este caso, el par iónico ($\text{H}^+ \text{Cl}^-$) que pudiera haber quedado ocluido en la matriz polimérica, se evapora, por efecto térmico del secado, con lo cual sólo se mide el Cl^- adsorbido por el complejo Pd (II)-oxina. Pese a todo, estas diferencias son prácticamente insignificantes.

Por otro lado, la Figura 20 muestra como el contenido de Cl^- unido a la resina aumenta repentinamente cuando el valor de Pd (II) adsorbido alcanza un valor cercano a 0,20, con lo que el Pd (II) está en defecto hasta este valor, considerando una relación molar de 1:1.

El estudio anterior (apartado 3.2.1) en que se ha obtenido la formación de una especie Pd (II)-oxina de estequiometría 1:1, se ha realizado mediante diversos experimentos en donde existía un exceso de Pd (II) respecto a la capacidad máxima del grupo oxina.

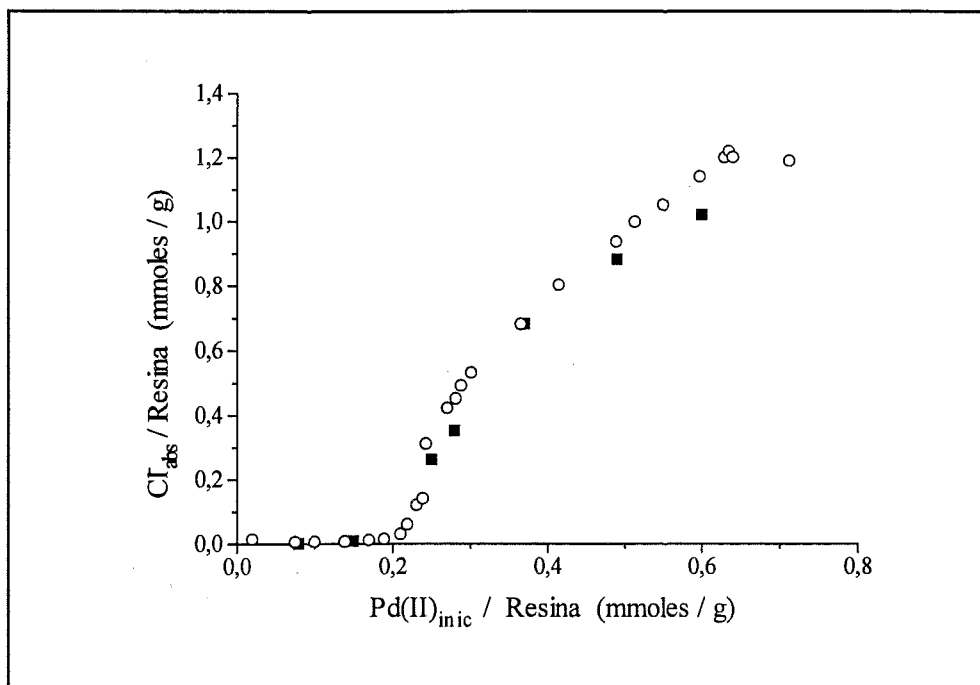
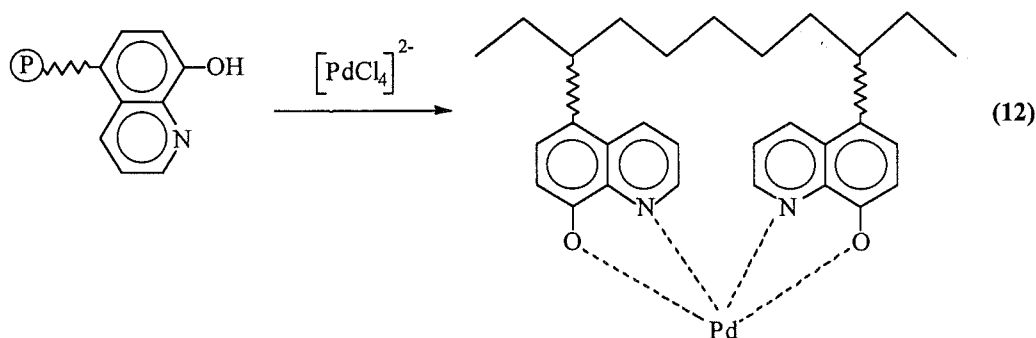


Figura 20. Representación del contenido en cloruro del Pd (II) inmovilizado.

- Análisis elemental
- Análisis potenciométrico

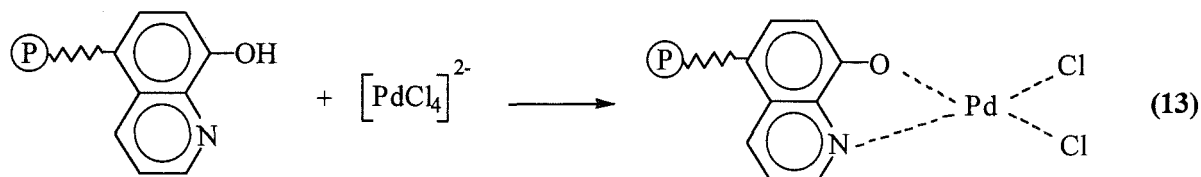
Cuando no existe este exceso, de acuerdo con los datos de la fase homogénea descritos,^{102,103,105} existen dos posibles especies de Pd (II)-Oxina en este sistema:

Por un lado, existe la posibilidad de formación del complejo de estequiometría Pd-Oxina 1:2, en el caso que los cuatro lugares de coordinación de Pd (II) sean ocupados por dos grupos oxina. Para ello el brazo espaciador que existe entre el grupo funcional Oxina y la matriz polimérica ha de ser suficientemente flexible.



La flexibilidad del brazo espaciador, es pues, de suma importancia en la formación de este complejo de estequiometría 1:2.

Por otro lado, es lógico que el complejo formado sea el 1:1 cuando existe suficiente cantidad de Pd (II). Posibilidad que se ve favorecida por la mayor accesibilidad de un sólo grupo oxina en la formación del quelato.



En la Figura 21 se muestra una representación de la predominancia de los dos complejos de este modelo. Hemos representado la relación entre Pd (II) inmovilizado en la resina y resina utilizada en el eje de ordenadas y en el eje de abscisa se representa la relación existente entre el Pd (II) inicialmente añadido al sistema y la resina utilizada. Ambos valores están expresados como cantidad de mmoles de Pd (II) por unidad de peso de resina. En esta figura se observa que, cuando la relación de Pd (II) respecto a la resina es baja, es decir, cuando el Pd (II) se encuentra en defecto frente a la oxina, la formación del complejo estequiométrico 1:2, Pd(Oxn)_2 , es el predominante en el sistema. Los valores de la representación gráfica se han obtenido para el caso del complejo 1:1 con la constante determinada en el apartado 3.2.1, y para el complejo 1:2 se ha resuelto el balance de masas correspondiente.

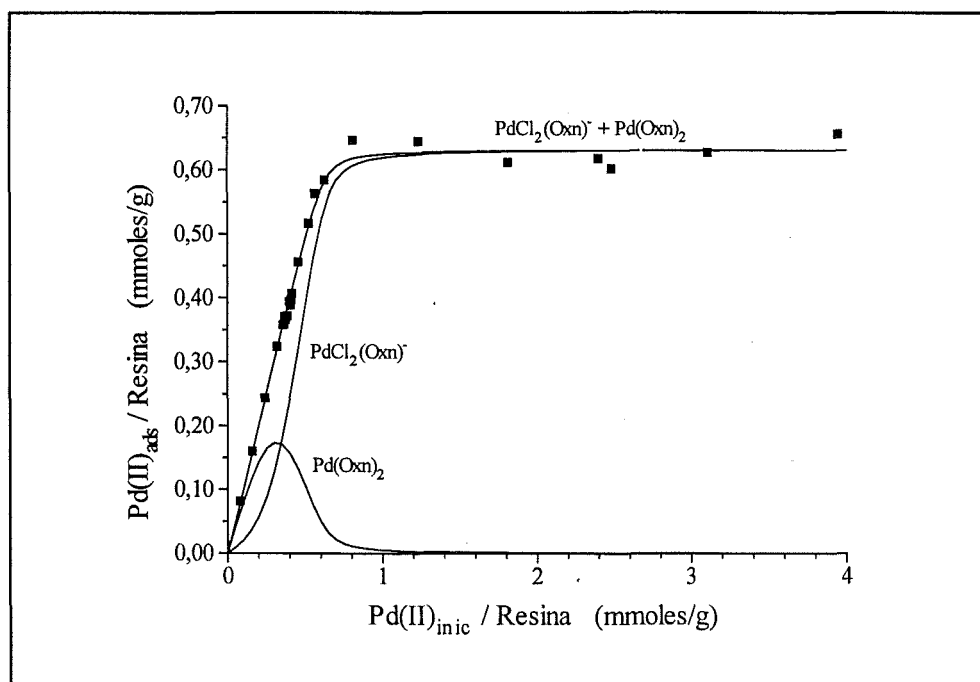


Figura 21. Representación de los complejos entre Pd (II), Cl⁻ y Oxina. Los puntos ■ representan los valores experimentales.

3.3. ADSORCIÓN DE L-AMINOÁCIDOS SOBRE Pd (II) INMOVILIZADO EN SPHERON OXINE 1000

Como se ha descrito anteriormente, se llevó a cabo el estudio sobre los siguientes L-aminoácidos: L-Triptófano, Trp; L-Tirosina, Tyr; L-Fenilalanina, Phe y Glicina, Gly.

La Tabla III recoge las estructuras de estos aminoácidos, donde puede observarse que todos ellos contienen grupos aromáticos, con excepción de la Glicina.

Tabla III. Estructura de los distintos L-aminoácidos en estudio.

$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \diagdown \\ \text{R} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CO}_2\text{H} \\ \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} $ L- Aminoácido		
<u>Estructura de R</u>	<u>Nombre</u>	<u>Abreviatura</u>
—H	Glicina	Gly
$ \begin{array}{c} \text{—CH}_2 \\ \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N} \\ \\ \text{H} \end{array} $	Triptófano	Trp
$ \text{—CH}_2 \text{---} \text{C}_6\text{H}_5 $	Fenilalanina	Phe
$ \text{—CH}_2 \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{OH} $	Tirosina	Tyr

Según el procedimiento experimental que se describió anteriormente, sobre una serie de columnas acondicionadas para esta etapa del estudio (es decir conteniendo el Pd (II) adsorbido sobre la resina y libre del posible Pd (II) adsorbido físicamente) se ponen en contacto 10 mL de disolución de L-aminoácido de concentración inicial comprendida en el rango de 2×10^{-6} - 1×10^{-2} M. En todos los casos el medio estaba regulado a pH=6,5, lo cual se consiguió con disolución de KH_2PO_4 0,01 M. El tiempo de contacto fue de 12 h.

La adsorción de aminoácidos se determinó mediante análisis espectrofotométrico (bien UV o fluorimetría), midiendo las diferencias entre el total de aminoácido y el aminoácido no adsorbido (remanente en la disolución), después del contacto con la resina.

3.3.1 ADSORCIÓN DE L-TRIPTÓFANO

En esta serie de experimentos la concentración inicial de este aminoácido se varió en un rango de 2×10^{-6} - 5×10^{-3} M. La determinación de Trp mediante UV se llevó a cabo a la longitud de onda de 278 nm.

Los datos experimentales obtenidos se recogen en la Tabla IV. La Figura 22 recoge estos datos, en la forma de mmoles Trp adsorbidos/g resina frente a moles Trp iniciales.

Tabla IV. Resultados obtenidos en los experimentos de adsorción de Trp por la resina Spheron Oxine 1000 cargada de Pd (II). En todos los experimentos se utilizaron 30 mg de resina y 10 mL de disolución de Trp.

moles Trp inic x 10^6	mmoles Trp ads / g resina
0,02	5×10^{-4}
0,08	$2,6 \times 10^{-3}$
0,40	$1,3 \times 10^{-3}$
2,00	$5,7 \times 10^{-2}$
10,00	0,2080
26,00	0,2400
40,00	0,2383
50,00	0,2398

Como se observa, existe un aumento en la adsorción del Trp por la resina hasta un valor de 0,24 mmoles/g resina. A partir de este valor no hay prácticamente variación apreciable en el número de moles adsorbidos, lo que supone la saturación de la resina y nos determina la capacidad de la misma.

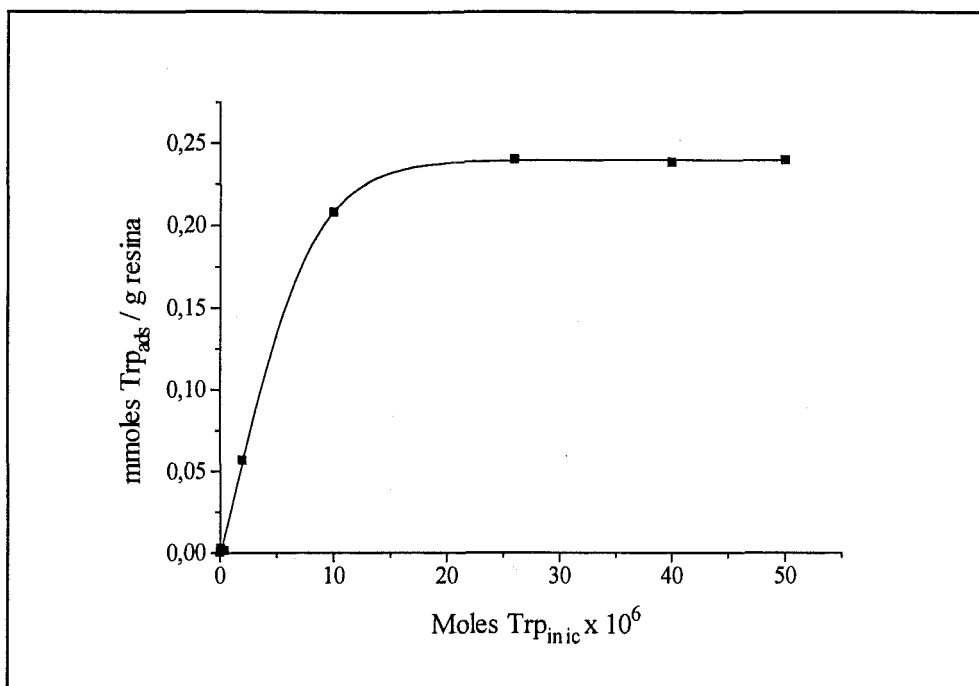


Figura 22. Representación de la adsorción de L-Triptófano sobre la resina Spheron Oxine 1000 cargada con Pd (II).

Este valor corresponde aproximadamente al 36,6 % de la capacidad teórica de la resina cargada (0,655 mmoles de Pd (II)/g resina).

Esta sensible diferencia puede deberse a dos causas:

- el posible impedimento estérico en la coordinación Pd (II)-aminoácido sobre la resina Spheron Oxine 1000, dado que la matriz polimérica tiene una gran densidad de grupos -OH⁻ que podrían interferir la aproximación del aminoácido,
- la posible influencia de la concentración de Cl⁻ que compite con el aminoácido en la coordinación de Pd (II).

3.3.2. ADSORCIÓN DE L-FENILALANINA

En este caso las concentraciones iniciales se variaron en el rango de 8×10^{-4} - 5×10^{-3} M de Phe. En las determinaciones espectrofotométricas la longitud de onda escogida, a la que se produce la máxima absorbancia, fue de 257 nm.

Los datos experimentales obtenidos se recogen en la Tabla V. Del mismo modo, la Figura 23 recoge estos datos, en la forma de mmoles Phe adsorbidos/g resina frente a moles Phe iniciales.

Tabla V. Resultados obtenidos en los experimentos de adsorción de Phe por la resina Spheron Oxine 1000 cargada de Pd (II). En todos los experimentos se utilizaron 30 mg de resina y 10 mL de disolución de Phe.

moles Phe iniciales x 10 ⁶	mmoles Phe ads / g resina
8,00	0,1527
11,25	0,2626
25,00	0,2900
41,58	0,2941
59,72	0,2950
80,28	0,3083
99,63	0,3102

En este caso se observa igualmente un aumento en la adsorción de Phe por parte de la resina hasta un valor de 0,30-0,31 moles Phe_{ads}/g resina, a partir del cual no se aprecia variación en el número de moles adsorbidos. Este valor representa un 47,4 % de la capacidad teórica. Esta diferencia, al igual que en el caso anterior, la atribuimos a la difícil accesibilidad del Pd (II) adsorbido en la resina.

El ligero aumento de la capacidad observado con respecto al Trp podría explicarse por una más fácil interacción entre el grupo funcional de la resina y Phe, basado en la mayor afinidad entre los grupos aromáticos presentes tanto en el aminoácido como en la resina.

Como se representó en la Tabla III, el grupo R de Phe es un metileno unido a benceno. Para el caso del Trp el grupo R es un metileno unido a indol. Por tanto, los impedimentos estéricos serán más importantes en el caso del Trp, ya que la coordinación de Trp con el Pd (II) unido al grupo oxina, tendrá mayor dificultad en el caso de tener un grupo como el indol o un único anillo, que en el caso de la Phe es de benceno.

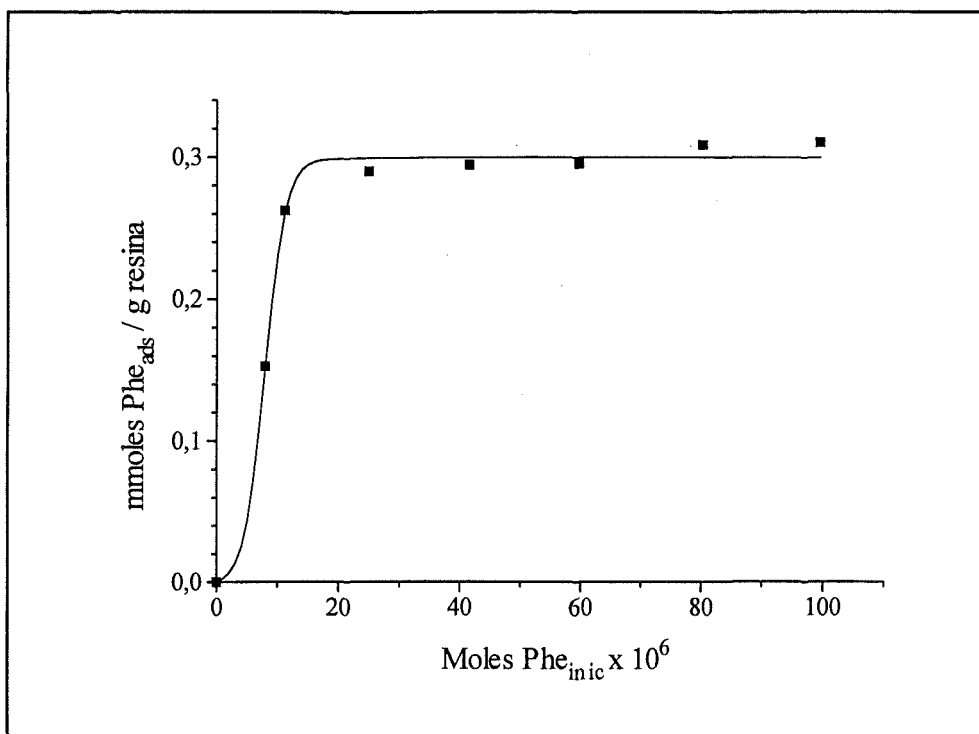


Figura 23. Representación de la adsorción de L-Fenilalanina sobre la resina Spheron Oxine 1000 cargada con Pd (II).

3.3.3. ADSORCIÓN DE L-TIROSINA

En este caso las concentraciones iniciales se variaron en el rango de 1×10^{-4} - 5×10^{-3} M de Tyr. En las determinaciones espectrofotométricas la longitud de onda a la que se produce la máxima absorbancia, y a la que se realizaron las medidas, fue de 276 nm.

Los datos experimentales obtenidos se recogen en la Tabla VI, y en la Figura 24 se recogen los datos experimentales en la forma de mmoles Tyr adsorbidos /g resina frente a moles Tyr iniciales.

Tabla VI. Resultados obtenidos en los experimentos de adsorción de Tyr por la resina Spheron Oxine 1000 cargada de Pd (II). En todos los experimentos se utilizaron 30 mg de resina y 10 mL de disolución de Tyr.

moles Tyr inic x 10 ⁶	mmoles Tyr ads / g resina
1,00	3x10 ⁻³
5,00	8,4x10 ⁻²
10,75	0,2367
28,66	0,2539
43,96	0,2519
52,48	0,2500

Como en los casos anteriores se observa un aumento en la adsorción de Tyr cuando se aumenta su concentración en la disolución de carga. El valor máximo es de 0,25 moles/g resina que representa el 38,2 % de la capacidad teórica de la resina. Valor a partir del cual no se aprecia variación en el número de moles adsorbidos.

Las diferencias entre Tyr y Phe no resultan tan evidentes desde el punto de vista del impedimento estérico. En este caso, nos encontramos con dos grupos R de naturaleza parecida, de hecho, la única diferencia aparece en torno a tener o no, un grupo hidroxilo unido al benceno en posición *para*. La explicación más lógica sería pensar que este grupo hidroxilo posiblemente interfiere con los grupos OH⁻ de la matriz acrílica, provocando ciertas tensiones que impedirían una respuesta semejante a la que se produce en ausencia de este hidroxilo.

En cambio, la similitud observada en este caso con respecto al Trp podría explicarse por la interacción de los grupos OH y NH con la matriz acrílica.

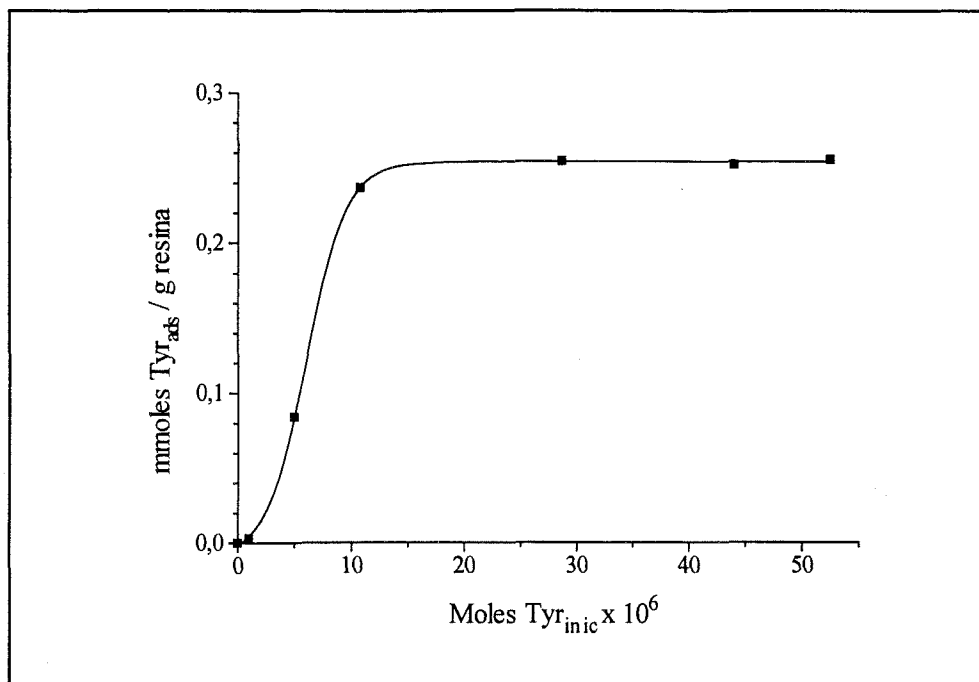


Figura 24. Representación de la adsorción de L-Tirosina sobre la resina Spheron Oxine 1000 cargada con Pd (II).

3.3.4. ADSORCIÓN DE GLICINA

El estudio de Glicina nos proporciona un buen ejemplo tanto para la comparación con los aminoácidos anteriores que contienen grupos aromáticos, como para una interpretación termodinámica del concepto IMAC, que abordaremos gracias a la extensa información sobre reacciones de complejación de la Gly con diversos iones metálicos (incluyendo el Pd (II)).

De este modo, los resultados que se obtengan, tanto de adsorción como de elución, podrán ser tomados como una aproximación a los sistemas *Pd (II)-aminoácido*, ya que todos ellos tienen una estabilidad parecida (sus constantes de formación varían en el rango de 9,11-10,46).⁴²

Los experimentos se llevaron a cabo de manera similar a la del resto de aminoácidos, es decir, poniendo en contacto 10 mL de disolución de aminoácido sobre una serie de columnas conteniendo el Pd (II) adsorbido sobre la resina. La concentración inicial estaba comprendida en el rango de 1×10^{-4} - 1×10^{-2} M. El tiempo de contacto se mantuvo durante 12 h, como en los casos anteriores.

Los análisis por fluorimetría se llevaron a cabo midiendo la fluorescencia del compuesto Gly-OPA, en presencia de 2-mercaptoetanol, siendo la longitud de onda de excitación de $\lambda_{exc} = 335$ nm y la longitud de onda de emisión de $\lambda_{em} = 452$ nm.

Los datos experimentales obtenidos están recogidos en la Tabla VII, y en la Figura 25 están

representados en la forma de mmoles Gly adsorbidos/g resina frente a moles Gly iniciales.

Tabla VII. Resultados obtenidos en los experimentos de adsorción de Gly por la resina Spheron Oxine 1000 cargada de Pd (II). En todos los experimentos se utilizaron 30 mg de resina y 10 mL de disolución de Gly.

moles Gly _{inic} x 10 ⁴	mmoles Gly _{ads} /g resina	moles Gly _{inic} x 10 ⁴	mmoles Gly _{ads} /g resina
2,55	0,084	13,74	0,281
2,94	0,093	16,8	0,294
4,02	0,109	22,53	0,308
4,71	0,141	24,81	0,314
5,04	0,161	28,73	0,316
5,46	0,17	30,50	0,309
5,91	0,184	33,21	0,313
6,55	0,212	35,30	0,306
7,17	0,231	37,56	0,312
8,07	0,239	39,32	0,306
8,34	0,257	39,85	0,317
9,51	0,265	41,53	0,312
11,41	0,286	42,92	0,314

En este caso la adsorción de Gly por parte de la resina tiene un valor máximo de 0,31 moles/ g resina. El valor obtenido de máxima adsorción representa en este caso un 48 % con respecto a la capacidad teórica. Como en los casos anteriores la Gly sufre de interferencias con la matriz acrílica en su aproximación para complejar el Pd (II) adsorbido. El relativo aumento de capacidad respecto a Tyr y Trp podría deberse a una relativa mayor capacidad de penetración en la red polimérica, por presentar menores impedimentos estéricos.

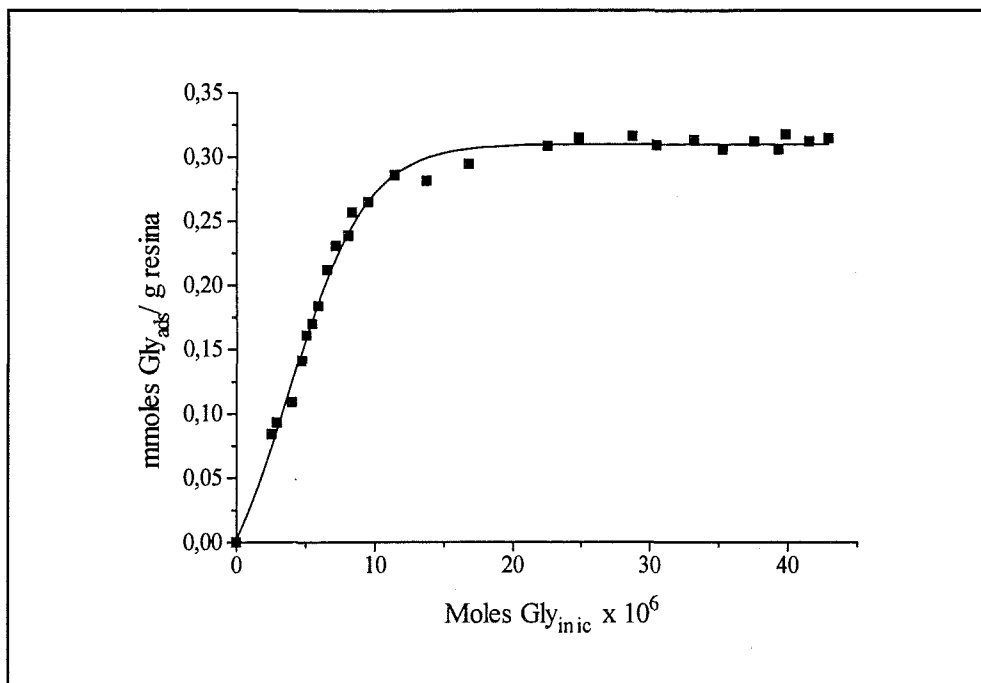
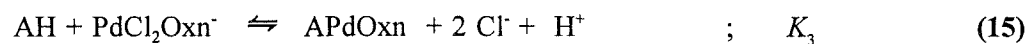
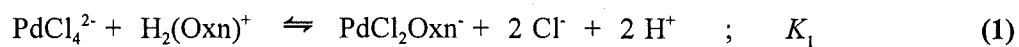


Figura 25. Representación de la adsorción de Glicina sobre la resina Spheron Oxine 1000 cargada con Pd (II).

3.4. ESTUDIO TERMODINÁMICO DE LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN DE L-AMINOÁCIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA IMAC

Con el objeto de caracterizar termodinámicamente el proceso IMAC hemos realizado un estudio basado en la formación de complejos binarios Pd (II)-resina y complejos ternarios Pd (II)-resina-aminoácido a través de las reacciones correspondientes.

Estas reacciones pueden representarse mediante las ecuaciones:



donde HOxn representa la resina Spheron Oxine 1000 y A⁻ el aminoácido.

De donde,

$$K_2 = \frac{[AH]}{[A^-][H^+]} \quad (16)$$

$$K_3 = \frac{[APdOxn][H^+][Cl^-]^2}{[AH][PdCl_2(Oxn)^-]} \quad (17)$$

Teniendo en cuenta que $[Cl^-] = 2 [APdOxn]$, y llamando

$$K^* = \frac{K_3}{[H^+]} \quad (18)$$

tenemos,

$$K^* = \frac{4 [APdOxn]^3}{[AH] (R - [APdOxn])} \quad (19)$$

donde R representa la "concentración" de la resina y lo determinamos según la expresión:

$$R = \frac{(C \times m)}{V} \quad (20)$$

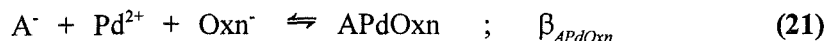
donde C es la capacidad de adsorción de la resina, m es el peso de resina y V es el volumen de la disolución del aminoácido.

Por otro lado, el valor de $[APd(Oxn)]$ se determina según:

$$[APdOxn^-] = [AH]_{inicial} - [AH]_{final}$$

Los valores de concentración de $[AH]_{inicial}$ y $[AH]_{final}$ se determinan espectrofotométricamente, y a su vez, la constante de estabilidad, K_3 , del complejo ternario APdOxn.

A partir de estos valores es posible calcular la constante de formación de la reacción:



según:

$$\log \beta_{(APdOxn)} = \log \beta_1 + \log K_2 + \log K_3 \quad (22)$$

donde, β_1 es el valor de la constante obtenida anteriormente en el estudio de la adsorción de Pd (II) sobre Spheron Oxine 1000 ($\log \beta_1 = 31,81$), y K_2 se obtiene de la bibliografía.⁴²

Los resultados obtenidos para los distintos aminoácidos se muestran en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Resultados de las constantes de estabilidad para el sistema complejo APdOxn.

Aminoácido	$\log \beta_1$	$\log K_2$	$\log K_3$	$\log \beta_{APdOxn}$
Gly	31,81	9,70	-10,79	30,72
Trp	31,81	9,48	-11,15	30,14
Phe	31,81	9,25	-10,84	30,22
Tyr	31,81	10,11	-11,09	30,83

3.5. ELUCIÓN DE L-AMINOÁCIDO

La elución de los aminoácidos se llevó a cabo en la misma columna cromatográfica donde previamente se había realizado tanto la inmovilización de Pd (II) como la adsorción de L-aminoácido. En este caso la adsorción de aminoácido se llevó a cabo en diferentes columnas donde se había puesto en contacto en todos ellos 10 mL de una misma concentración de aminoácido inicial. Tras pasar por la columna tres veces 10 mL de disolución 0,01 M de tampón KH_2PO_4 pH = 6,5, se introducen en la columna 10 mL de disoluciones de elución con valores de pH comprendidos entre 0 y 5. Los aminoácidos en estudio fueron Triptófano y Glicina.

En el caso del Trp se utilizaron, HCl o H₂SO₄, para preparar las disoluciones de elución a los valores de pH referidos anteriormente. En el caso de la Glicina se comparó la elución de HCl con una disolución 20 mM de Imidazol a pH = 6,5.

En todos los experimentos, tras la elución del aminoácido, se efectuaron análisis de Pd (II) de las muestras, para comprobar que la elución corresponde al aminoácido y no al ion metálico inmovilizado en la resina. En todos los casos se apreció un porcentaje muy bajo de Pd (II) eluido, por lo que el sistema en estudio asegura un correcto comportamiento IMAC.

3.5.1. ELUCIÓN DE L-TRIPTÓFANO

De la elución de Trp con HCl y H₂SO₄ se obtuvieron los resultados que se pueden ver resumidos en la Tabla IX, estando representados en la Figura 26.

Los valores obtenidos de la elución con HCl y H₂SO₄, muestran que no existen diferencias significativas entre los dos tipos de ácido. En los dos casos, como cabía esperar, se eluye un porcentaje menor al aumentar el pH.

La diferencia más clara existente entre una y otra disolución ocurre a valor de pH cercano a 1.

Tabla IX. Resultados obtenidos de la elución de Trp con HCl y H₂SO₄.

<u>HCl</u>		<u>H₂SO₄</u>	
pH	%Elución	pH	%Elución
0,0	89,3	0,0	100,0
0,5	79,6	0,6	72,5
1,1	52,8	1,2	27,4
2,2	12,7	1,7	19,3
3,1	1,4	2,6	12,5
4,1	0,1	3,3	2,1
5,1	0,1	5,6	1,2

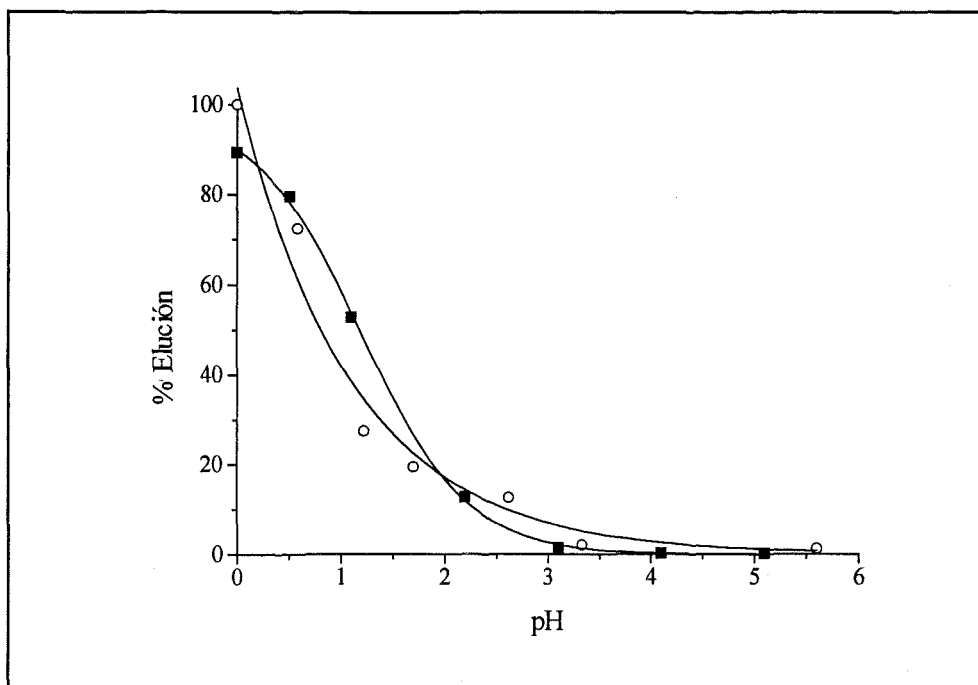


Figura 26. Representación de los resultados de elución de Trp con ácido clorhídrico (■) y ácido sulfúrico (○).

En ambos casos se observa un descenso muy acusado de la elución con el aumento del pH, así entre pH 0 y 2 se pasa de aproximadamente un 100 % de elución a menos del 20 %.

Estos resultados manifiestan que el parámetro que determina la elución es la acidez del medio ya que el ion Cl^- no muestra ninguna actividad al respecto bajo estas condiciones.

3.5.2. ELUCIÓN DE GLICINA

Los resultados obtenidos de la elución de Gly con HCl se muestran en la Figura 27. Estos resultados ilustran dos tipos de elución radicalmente distintos. Así, mientras con HCl la elución se lleva a cabo por la competitividad del H^+ con el Pd^{2+} , en el caso del imidazol son las diferencias en la formación del complejo correspondiente las responsables de dicho proceso de elución.

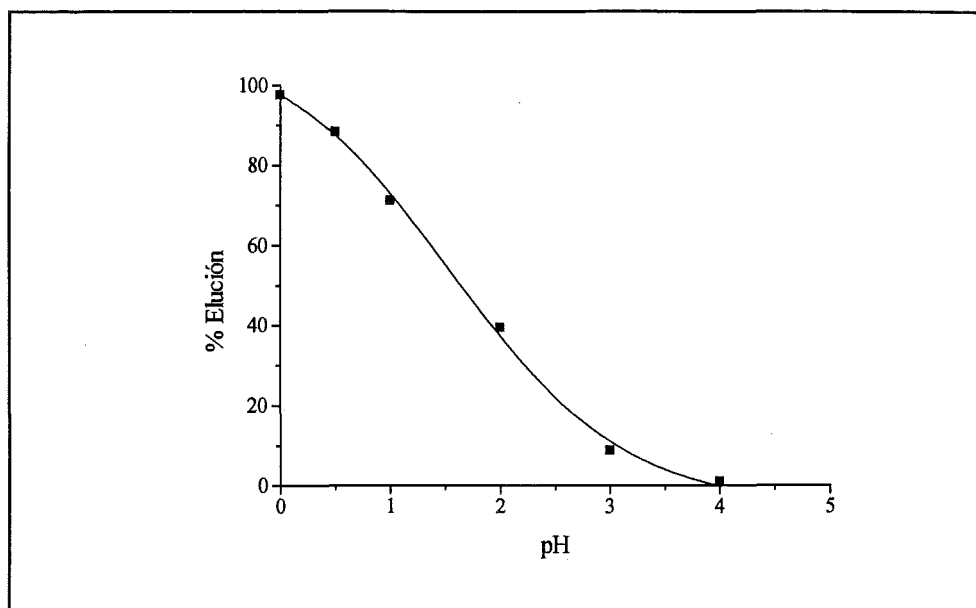
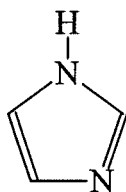


Figura 27. Representación de los resultados de elución de Gly con ácido clorhídrico (■)

Como en el caso de Triptófano, la elución con HCl muestra un fuerte descenso al aumentar el pH. En este caso la elución de la Glicina es ligeramente superior que en el caso del Triptófano.

Por otro lado se llevó a cabo la elución de Glicina con imidazol.²²



Imidazol

El procedimiento se llevó a cabo de forma similar a la elución ácida. En este caso, la adsorción de Gly se realizó en diferentes columnas donde se había puesto en contacto en todas ellas 10 mL de una misma concentración inicial, todas las columnas fueron eluidas con la misma disolución de imidazol que corresponde a una concentración de 20 mM en 0,16 M de K_2HPO_4 a $pH=6,5$.

De los análisis sobre cinco experiencias se obtuvo un porcentaje de elución que corresponde al $54,3\% \pm 0,5\%$ de Gly.

Comparando estos resultados, con los obtenidos con HCl, se observa que el mecanismo de elución es completamente distinto. En este caso se establece una competitividad entre el imidazol y el aminoácido correspondiente por la coordinación del Pd (II) mientras que en el caso del ácido HCl la elución es el producto de la competitividad del H^+ y el propio Pd (II) por el correspondiente aminoácido.

3.5.3. INTERPRETACIÓN TERMODINÁMICA DE LA ELUCIÓN CON ÁCIDO

Basándonos en los parámetros termodinámicos obtenidos en los estudios básicos de adsorción podremos realizar una interpretación de los resultados del proceso de elución de Glicina.

Para este cálculo hemos tenido en cuenta el modelo de comportamiento del sistema basado en las ecuaciones (1), (9), (10) y (14).

Dicho comportamiento teórico se ha realizado numéricamente utilizando el programa SED,¹⁰⁰ donde se observa que la curva teórica obtenida sigue la tendencia de los datos experimentales, aunque existen claras diferencias en el comportamiento. Estas diferencias podrían explicarse por el origen de alguno de los datos utilizados en el cálculo, los cuales se refieren especialmente al empleo de constantes de formación en fase homogénea, cuando el sistema en el que trabajamos es en fase heterogénea. Los procesos de difusión interna que tienen lugar en fase resina no están contemplados en este modelo de interpretación termodinámica, lo que podría determinar las diferencias observadas. Los resultados obtenidos de dicho cálculo se representan en la Figura 28.

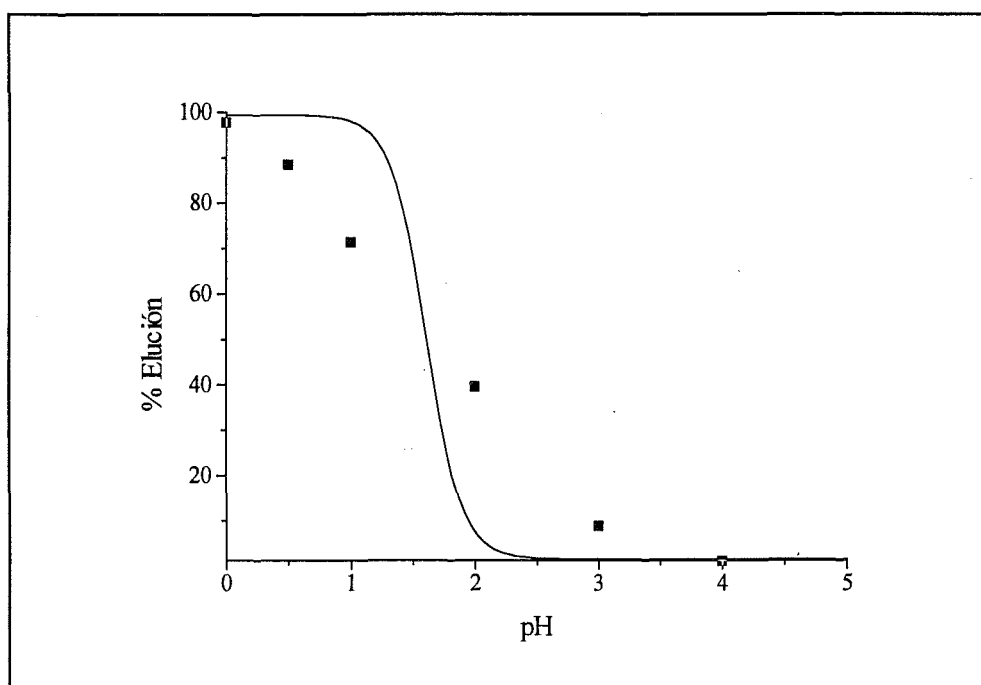


Figura 28. Representación de los resultados de elución de teórica de Gly con ácido clorhídrico. (■) Resultados de la elución experimental con HCl.

Por otro lado, aplicando una determinación de las especies de Pd (II) en el sistema podremos verificar que el modelo teórico se corresponde con los datos experimentales. Así, el cálculo de la fracción de Pd (II) frente a pH nos muestra que el Pd (II) permanece en fase resina. Los resultados obtenidos de dicho cálculo están representados en la Figura 29.

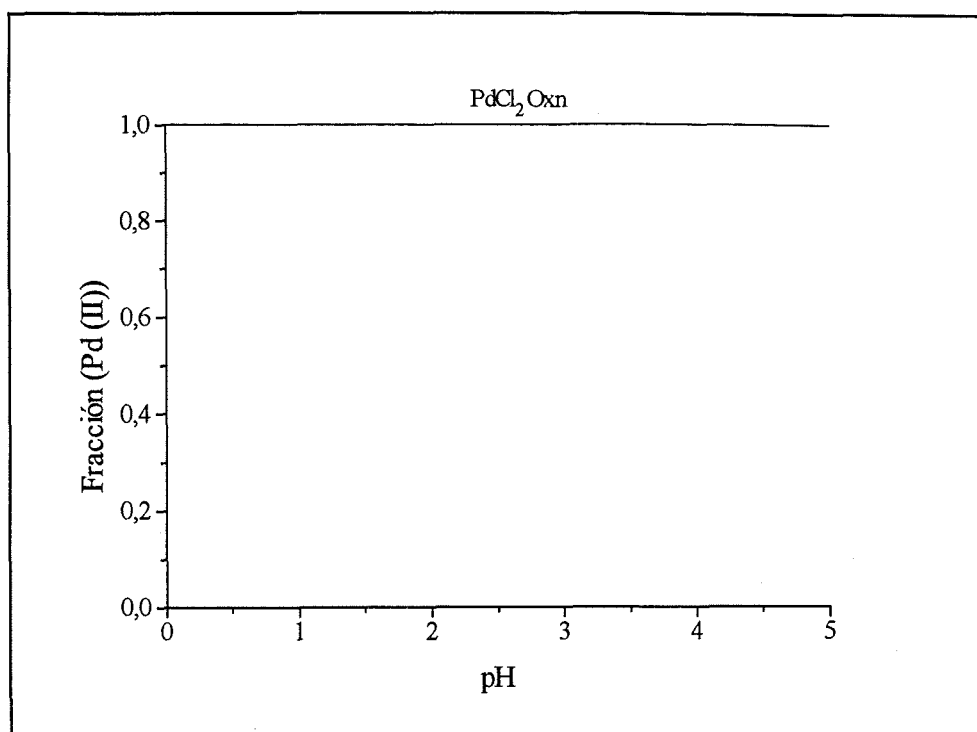


Figura 29. Representación de la concentración de paladio en disolución.

Estos resultados confirman los análisis mediante ICP donde se observó que el Pd^{2+} no se eluye conjuntamente con el aminoácido lo que reafirma un correcto comportamiento IMAC.

Por otro lado, utilizando los resultados obtenidos en la adsorción y elución del aminoácido podemos estimar el valor de la constante de estabilidad del complejo ImidazolPd(Oxn). Esta estimación se basa en el hecho que el método IMAC funciona para el sistema presente.

Asumiendo que en el proceso de elución la relación molar de imidazol-Pd (II) es 1:1, el complejo ternario puede ser expresado por la ecuación:



donde IH representa el imidazol e IPdOxn el complejo ternario

Así pues, podemos escribir la constante de equilibrio correspondiente según:

$$K_{\text{IPdOxn}} = \frac{[\text{IPdOxn}] [\text{AH}]}{[\text{IH}] [\text{APdOxn}]} \quad (24)$$

En general, podemos escribir,

$$\log \beta_{IPdOxn} = \log K_{IPdOxn} + \log K_{Imidazol} + \log K_{APdOxn} \quad (25)$$

Estas ecuaciones nos determinan el valor de la constante de formación del complejo para la elución del aminoácido Gly según:

$$\log \beta_{IPdOxn} = -1,64 + 7,12 + 30,72 = 36,20$$

Este valor nos determina una mayor formación del complejo IPdOxn que la correspondiente a la formación de GlyPdOxn ($\log K=30,72$), con lo cual la disolución de imidazol es un buen eluyente de este aminoácido bajo estas condiciones de trabajo.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Skoog, A. D. and Leary, J.J., *"Principles of Instrumental Analysis"*, Fourth Edition, Saunders College Publishing, 579-671 (1992).
2. Harris, D.C. *"Análisis Químico Cuantitativo"*. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A., (1992).
3. Armstrong, D.W., *Anal. Chem.*, **59**, 84A (1987).
4. *"Affinity Chromatography"*. Principles & Methods. Pharmacia, (1994).
5. Freifelder, D. *"Técnicas de bioquímica y biología molecular"*, Ed. Reverté, S.A. (1981).
6. Helfferich, F.G., *Nature*, **189**, 1001 (1961).
7. Pearson, R.G., *J. Chem. Educ.*, **45**, 581-587 (1968).
8. Porath, J., Garlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G., *Nature*, **258**, 598 (1975).
9. Porath, J. and Belew, M., IMA-Chromatography (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) in *"Affinity Chromatography and Biological Recognition"*, Chaiken, I.M., Wilcheck, M. and Parikh, I, Eds., 173-189, Academic Press. Orlando, FL, U.S.A. (1983).
10. Porath, J. and Olin, B., *Biochemistry*, **22**, 1621-1630 (1983).
11. El Rassi, Z. and Hovarth. *J. Chromatogr.*, **359**, 241-253 (1986).
12. Sulkowski, E. Immobilized metal ion affinity chromatography of proteins, in *"Protein Purification: Micro to Macro"*, Liss, A., Ed., 149-169 (1987).
13. Anderson, L., *ISI Atlas Sci. Biochem.*, 318-322 (1988).
14. Porath, J., *J. Mol. Recog.*, **3**, 123-127 (1990).
15. Liu, Y. and Shilin, Y., *J. Chromatogr.*, **515**, 169-73 (1990).
16. Birkenmeir, G. et al., *J. Chromatogr.*, **539**(2), 276-77 (1991).
17. Porath, J. et al., *Prot. Expr. Purif.*, **2**(1), 24-8 (1991).
18. Yipp, T.T. et al., *J. Chromatogr.*, **604**(1), 125-32 (1992).
19. Herve, F. Chaga, G. et al., *J. Chromatogr.*, **577**(1), 43-59 (1992).
20. Chaga, G. et al. *J. Chromatogr.*, **604**(1), 177-83 (1992).
21. Porath, J., *Prot. Expr. and Purif.*, **3**, 263-281 (1992).
22. Zachariou, M. and Hearn, M.T.W., *J. Chromatogr.*, **599**, 171-177 (1992).
23. Anderson, L. and Porath, J., *Anal. Biochem.*, **154**, 250-254 (1986).
24. Muszynska, G., Anderson, L. and Porath, J., *Biochemistry*, **5**, 6850-6853 (1986).
25. Dobrowolska, G., Muszynska, G. and Porath, J., *J. Chromatogr.*, **541**, 331-339 (1991).
26. Sundberg, L. and Porath, J., *J. Chromatogr.*, **90**, 87-98 (1974).
27. Porath, J. and Axen, R. Immobilization of Enzymes to Agar, Agarose and Sephadex Supports. In *"Methods in Enzymology"*, Mosbach, K. Ed., Vol. 44, 19-45. Academic Press, New York/ San Francisco/London, (1977).
28. Hemdan, E.S. and Porath, J., *J. Chromatogr.*, **323**, 247-254 (1985).

29. Hemdan, E.S. and Porath, J., *J. Chromatogr.*, **323**, 255-264 (1985).
30. Vijayalakshilli, M.A., High-performance liquid chromatography with immobilized metals absorbents, in "*Affinity Chromatography and Biological Recognition*", Chaiken, I.S.M., Wilchek, M. and Parikh, I., Eds., 269-273, Academic Press, Orlando, FL, U.S.A. (1983).
31. Fanou-Ayi, L. and Vijayalakshmi, M.A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **413**, 300-352 (1984).
32. Small, D.A.P., Atkinson, T., and Lowe, C.R., High-performance metal chelate chromatography, in "*Affinity Chromatography and Biological Recognition*", Chaiken, I.M., Wilchek, M. and Parikh, I., Eds., 267-268, Academic Press, Orlando, FL, U.S.A. (1983).
33. Chiecz, R.M. and Regnier, F.E. in "*Methods in Enzymology*", Deutscher, M.P., Ed., Vol. 182, 417-421, Academic Press, San Diego, CA, U.S.A. (1990).
34. Figueroa, A., Corradini, C., Feibuch, B. and Karger, B.L., *J. Chromatogr.*, **371**, 335-352 (1986).
35. Mantovaara, T., Pertoft, H. and Porath, J., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**, 56 (1989).
36. *Ibid*, **13**, 120-126 (1991).
37. *Ibid*, 371-379 (1991).
38. Hochuli, E., Böbeli, H. and Schacher, A., *J. Chromatogr.*, **411**, 177-184 (1987).
39. Porath, J., Jensen, J.C. and Lääs, T., *J. Chromatogr.*, **60**, 167-177 (1971).
40. Porath, J., Lääs, T. and Janson, J.C., *J. Chromatogr.*, **103**, 49-62 (1975).
41. Kato, Y., Nakamura, K. and Hashimoto, T., *J. Chromatogr.*, **354**, 511-517 (1986).
42. Sillén L.G., "*Stability Constants of Metal-Ion Complexes*", Section 2: Organic Ligands, The Chemical Society, London, (1964).
43. Gulko, A., Feigenbaum, H., Schmuckler, G., *Anal. Chim. Acta*, **59**, 397-402 (1972).
44. Myasoedova, G.V., Bol'shakova, L.I., Shvdeva, O.P. and Savvin, S.B., *Zh. Anal. Khim.*, **28**(8), 1150-3 (1973).
45. Sykora, V., Dubsky, F., Vyskocilova, O. and Chladna, J., *Sb. Vys. Sk. Chemicotechnol., Pr. Anal. Chem.*, **293**, 115-17 (1987).
46. Yamahara, T., Deguchi, T. and Nakamura, S., Japanese Pat. 75,57,024 (1973) (to Sumitomo Chemical Company).
47. Kettrup, A. and Grote, M., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **293**, 115-17 (1978). *Chem. Abs.* **90**: 96957z .
48. Grote, M. and Kettrup, A., *Vom Wasser*, **53**, 185-8 (1979). *Chem. Abs.* **93**: 76681p.
49. Grote, M. and Kettrup, A., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **295**, 336-70 (1979). *Chem. Abs.* **91**: 48816b.
50. *Ibid*, **300**, 280-5 (1980). *Chem. Abs.* **93**: 115293k.
51. Grote, M., Wigge, P. and Kettrup, A., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **310**, 369-77 (1982). *Chem. Abs.* **96**: 228108j.
52. Grote, M., Schwalk, A. and Kettrup, A., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **313**, 297-303 (1982). *Chem. Abs.* **98**: 100332b.

53. Grote, M., Schwalk, A., Huppe, U. and Kettrup, A., V., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **316**, 247-52 (1983). *Chem. Abs.* **99**: 224121x.
54. Seshadri, T. and Kettrup, A., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **310**, 1-5 (1982). *Chem. Abs.* **96**: 154524t.
55. Grote, M. and Kettrup, A., The separation of noble metals by ion exchangers containing S-bonded dithizone and dehydrodithizone as functional groups, in *"Ion Exchange Technology"*, Naden, D. and Streat, M., Society of Chemical Industry, Ellis Horwood Limited, Chichester, 618-25 (1984).
56. Hudson, M.J., The selective recovery of some platinum group and precious metals using copolymers with covalently bound 1,3,4-thiadiazole-2,5-dithiol groups and dithiocarboxylato groups, in *"Ion Exchange Technology"*, Naden, D. and Streat, M., Society of Chemical Industry, Ellis Horwood Limited, Chichester, 611-18 (1984).
57. Hudson, M.J. and Thorns J.F., *Hydrometallurgy*, **11**, 289-95 (1983).
58. Kalal, J., Kalalova, E., Jandova, L. and Svec, F., *Angew. Makromol. Chem.*, **115**, 13-22 (1983).
59. Zhang, C.S., Chain, Y.E. and Hua, Z.F., *Nucl. Tech.*, **19**(1), 46-8 (1980).
60. Bayer, E., Eberhardt, H. and Geckeler, K., *Angew. Makromol. Chem.*, **97**, 217-30 (1981). *Chem. Abs.* **95**: 190514c.
61. Phillips, R.J. and Fritz, J.S., *Anal. Chem.*, **50**, 1504-8 (1978).
62. Moyers, E. and Fritz, J.S., *Anal. Chem.*, **48**, 1117-20 (1976).
63. Liu, C.Y. and Sun, P.J., *Anal. Chim. Acta*, **132**, 187-93 (1981).
64. Sykora, V., Dubsy, F., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 33, 1504 (1972).
65. Eliseeva, O.P., Savvin, S.B. and Gracheva, R.F., *Zh. Anal. Khim.*, **25**, 45 (1970).
66. Eccles, H. and Vernon, F., *Anal. Chim. Acta*, **66**, 231 (1973).
67. Dedkov, Yu.M., Eliseeva, O.P., Ermakov, A.N., Savvin, S.B. and Slotintseva, M.G., *Zh. Anal. Khim.*, **27**, 726 (1972).
68. Savvin, S.B., Antokol'skaya, I.I., Myasoedova, G.V., Bol'shakova, L.I., and Shvoeva, O.P., *J. Chromatogr.*, **102**, 287 (1974).
69. Malofeeva, G.I., Myasoedova, G.V. and Volynets, M.P., *Mikrochim. Acta*, **1**, 391 (1978).
70. Myasoedova, G.V. and Savvin, S.B., *"Chelate-Forming Sorbents"*, Nauka, Moscow, (1984). *Chem. Abs.* **101**: 236104s.
71. Hering, R., *Chelate Forming Ion Exchanger (Monographs on Ion Exchange, Vol. 3)*, Akad.Verlag: Berlin, (1967). *Chem. Abs.* **66**: 11348m
72. Myasoedova, G.V., Antokol'skaya, I.I., Shvoeva, O.P., Bol'shakova, L.I. and Savvin, S.B., *Talanta*, **23**, 866 (1976).
73. Antokol'skaya, I.I., Myasoedova, G.V., Bol'shakova, L.I., Ezernitskaya, M.G., Volynets, M.P., Karyakin, A.V. and Savvin, S.B., *Zh. Anal. Khim.*, **31**, 742 (1976).
74. Koster, G. and Schmuckler, G., *Anal. Chim. Acta*, **38**, 179 (1967).

75. Warshawsky, A., Fieberg, M.M., Mihalik, P., Murphy, G. and Ras, Y.B., *Sep. Purif. Methods*, **9**, 209 (1980).
76. Ke, P.J. and Thibert, R.J., *Mikrochim. Acta*, 417 (1973).
77. Burba, P., Röber, H.M. and Lieser, K.H., *Angew. Macromol. Chem.*, **66**, 131 (1978). *Chem. Abs.* **88**: 122295n.
78. Griesbach, M. and Lieser, K.H., *Z. Anal. Chem.*, **302**, 181 (1980).
79. Bauman, A.J., Weetall, H.H. and Weliky, N., *Anal. Chem.*, **39**, 932 (1967).
80. Grosh, J.P. and Das, H.R., *Talanta*, **28**, 274 (1981).
81. Basargin, N.N., Rozovskii, Yu.G., Zharova, V.M., Volchenkova, V.A., Mikhaelyan, A.I., Gorshov, V.V. and Oyuun, Zh., "*Organic Reagents and Chelate Sorbents in Analysis Of Mineral Objects*", Nauka, Moscow, 1980. *Chem. Abs.* **93**: 230087h.
82. Srafion NMRR, a trademark of Ayalon Company, Haifa.
83. Goldstein, S., Silberg, M. and Schmuckler, *Ion Exch. Mem.*, **1**, 225-9 (1974).
84. Warshawsky, A., South African Pat. 71/498 (1972).
85. Slovak, Z., Slovakova, S. and Smrz, M., *Anal. Chim. Acta*, **75**, 127-138 (1975).
86. Catálogo de Novagen, (1993).
87. Geckeler, K., Lange, G., Eberhardt, H. and Bayer, E., *Pure Appl. Chem.*, **52**, 1883-905 (1980).
88. Anticó, E., Masana, A., Salvadó, V. and Valiente, M. *Anal. Chim. Acta. In press.* (1994).
89. Anticó, E., Masana, A., Hidalgo, M., Salvadó, V., Havel, J. and Valiente, M., *Anal. Chim. Acta*, **278**, 91-97 (1993).
90. Lehninger, A.L. "*Principios de Bioquímica*", Ed. Omega, S.A., (1986).
91. "*Textbook of Biochemistry with clinical correlations*", Second Edition, Devlin, T.M., Ed., A Wiley medical publication, John Wiley & Sons, (1986).
92. Wieland, T., *Berichte*, **77**, 539 (1944).
93. Winters, J.C. and Kunin, R., *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 460 (1949).
94. Moore, S. and Stein, W.H., *J. Biol. Chem.*, **211**, 893 (1954).
95. Kunin, R., "*Ion Exchange Resins*", 290pp., Krieger, Ed., Huntington, N.Y., (1972).
96. Roth, M., *Anal. Chem.*, **43**, 880-883 (1971).
97. Hillmann, G., *Z. Physiol Chem.*, **277**, 222 (1943).
98. Vogel, A.I. "*Textbook of Quantitative Chemical Analysis*". Scientific & Technical. Fifth Edition. Longman, London, (1989).
99. Catálogo de BioRad, (1993).
100. Puigdomènech, I. *INPUT, SED and PREDOM: Computer Programs Drawing Equilibrium Diagrams*. TITRA-OOK-3010, Royal Institute of Technology, Dept. Inorg. Chem., Stockholm, Sweden, 12pp.
101. Petit, L.D. and Bezer, M., *Coord. Chem. Rev.*, **61**, 97 (1985).
102. Levason, W. and McAuliffe, C.A., *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **13**, 123 (1977).

103. Wilson, E.W. Jr. and Martin, R.B., *Inorg. Chem.*, **10**, 1197 (1971).
104. Cotton, F.A. and Wilkinson, G., "*Advanced Inorganic Chemistry*", Third Edition, John Wiley & Sons, N.Y., Interscience Publishers, (1972).
105. Sandell, E.B., "*Colorimetric Determination of Traces of Metals*", 2nd Edition, Interscience Publishers, Inc, New York, (1950).
106. Baes, C.F., Mesmer, R.E., "*The Hydrolysis of Cations*", John Wiley & Sons, New York (1976).
107. Dorfner, K., Introduction to Ion Exchange and Ion Exchangers. In "*Ion Exchangers*", Dorfner, K., Ed., Walter de Gruyter & Co., New York, 7-189 (1991).

CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios realizados que recoge la presente memoria pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

- 1.- El estudio de las características de las muestras de aguas ácidas de mina revela los siguientes fenómenos:
 - a) La variación del pH de la disolución con la adición de base fuerte viene determinada por el contenido de los iones Fe (III) y Al (III).
 - b) La relativa disminución del contenido de los iones Cu (II) y Zn (II) con el pH (para valores inferiores a 5) se debe fundamentalmente a un proceso de adsorción de dichos iones en el precipitado de hidróxido férrico.
 - c) La variación de las características redox de las aguas ácidas con el pH se debe exclusivamente a la precipitación del ion Fe (III) de donde puede deducirse que el contenido de hierro que permanece en disolución por encima de un valor de pH de 5, es prácticamente Fe (II).
 - d) Finalmente, es importante observar que las diferencias entre las aguas del drenaje interior de la mina y las aguas que corresponden a la toma del río, se deben, no solamente a las diferencias en su contenido en iones metálicos (más diluidas las de la toma del río), sino al estado de oxidación de las muestras que como cabía esperar es más acusado en las aguas de la toma del río.

- 2.- Las dos resinas estudiadas ofrecen un comportamiento frente a la adsorción de Cu (II) y Zn (II) totalmente distinto. Para el caso de la resina Duolite C467 (resina portadora del grupo fosfónico en forma de base fuerte) la adsorción de Cu (II) y Zn (II) tiene un comportamiento poco diferenciado y la capacidad de adsorción para ambos metales es particularmente baja. Por lo que su utilización en la aplicación objeto del estudio queda descartada.
Por el contrario, la resina Amberlite IRC-718, muestra un buen grado de separación para Cu (II) y Zn (II), así como una capacidad de adsorción suficientemente alta. Por lo que esta resina es la que se ha utilizado en el estudio y aplicación realizado.

- 3.- La caracterización del comportamiento de la resina tanto a nivel termodinámico como en la dinámica del estudio en continuo presenta los siguientes resultados:
 - a) Los valores de las constantes de la reacción de adsorción obtenidas a pH 4 (constantes condicionales) muestran los valores de $\log K_{Cu}^* = 3,8 \pm 0,1$ M y $\log K_{Zn}^* = 3,0 \pm 0,1$ M, lo que explica la mayor afinidad que tiene esta resina por el Cu (II) frente al Zn (II). Asimismo, la capacidad de esta resina es de 0,74 mmoles/mL para el Cu (II) y de 0,54 mmoles/mL para el Zn (II).

- b) Los estudios en continuo muestran por un lado el efecto del pH en la capacidad de adsorción de los metales. Esto supone, por ejemplo, para el caso del Cu (II) un aumento de un 35% en la adsorción cuando el pH se varía entre 2 y 3.

Por otro lado, la velocidad lineal de flujo influye negativamente en el proceso de adsorción lo que supone, para la adsorción de Cu (II), una disminución de un 30% cuando esta velocidad lineal se aumenta de 2 a 3 cm/min.

- 4.- Los procesos de síntesis orgánica para la incorporación de los grupos fosfónico, fosfínico, éster fosfónico y ácido fosfónico/amina sobre polímeros basados en estireno y polímero de Merrifield entrecruzado con un 2% de divinilbenceno, han resultado eficientes, obteniéndose las correspondientes resinas de comportamiento mono o bifuncional.

La caracterización de las resinas ha mostrado un alto grado de funcionalización en cada uno de los sistemas estudiados.

- 5.- El proceso de adsorción de los iones Cu (II) y Zn (II) por las resinas mencionadas anteriormente ha mostrado una alta capacidad para los grupos fosfónico y fosfínico. Capacidades que han sido mucho menores para las otras resinas sintetizadas. En estos procesos se ha puesto de manifiesto, por un lado que la reacción para la adsorción de los metales no llega a saturar totalmente los grupos funcionales. Por otro lado, se ha observado la posible bifuncionalidad de los grupos fosfínicos que específicamente, ha resultado en la adsorción de Cu (II) y no en la adsorción de Zn (II) (ion menos oxidante).

- 6.- La velocidad de adsorción de los iones metálicos por las resinas en estudio ha puesto de manifiesto una serie de diferencias. De esta forma las resinas con fosfónico y fosfínico han mostrado ser las más rápidas y su comportamiento podría ser explicado mediante un mecanismo de reacción de primer orden. Asimismo, estas resinas adsorben más rápidamente el ion Zn (II) que no el Cu (II). Por otro lado, las otras resinas muestran velocidades de reacción varios ordenes de magnitud inferiores y los mecanismos cinéticos son asimismo diferenciados.

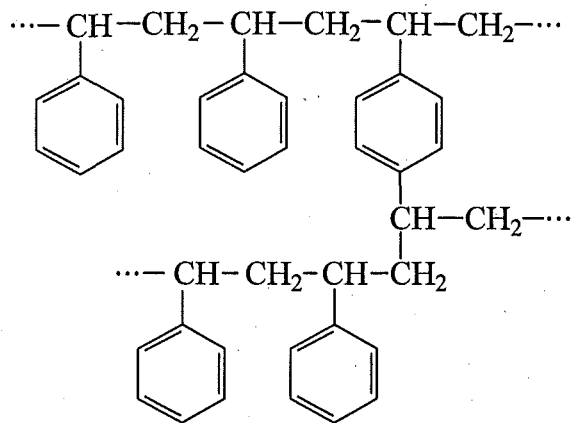
- 7.- La utilización de la resina Spheron Oxine 1000 (resina metacrílica con grupos 8-hidroxiquinoleína) ha mostrado ser eficaz en la inmovilización de Pd (II) a partir de disoluciones de este ion en medio cloruro, siendo la capacidad máxima de adsorción de 0,655 moles por gramo de resina.

- 8.- Se ha puesto de manifiesto que la estabilidad del complejo correspondiente entre la resina en estudio y el ion Pd (II) es suficientemente alta ($\log K=5,36$) para la determinación de las características de inmovilización de este ion en la técnica IMAC. El estudio termodinámico correspondiente revela que el complejo formado por la resina y el Pd (II) tiene la estequiometría $PdCl_2(Oxn)^-$, lo que supone que la coordinación del Pd (II) se lleva a cabo. La quelatación supone ocupar dos de las cuatro posiciones, siendo las otras dos ocupadas por los cloruros.
- 9.- La adsorción de los aminoácidos L-Trp, L-Tyr, L-Phe, Gly sobre la resina cargada con Pd (II) se realiza mediante un equilibrio reversible que supone el desplazamiento de los dos cloruros mencionados anteriormente, en la esfera de coordinación del paladio.
La capacidad de adsorción de esta matriz por los aminoácidos mencionados supone los valores de 0,24; 0,25; 0,31 y 0,31 mmoles de aminoácido/ g resina, respectivamente.
- 10.- La caracterización termodinámica de los procesos de adsorción de los aminoácidos por la resina cargada con Pd (II) ha supuesto la determinación de las constantes de estabilidad de la reacción correspondiente.
Los valores logarítmicos de estas constantes globales de formación varían entre 30,14 y 30,83, correspondiendo a una estequiometría de $APdOxn$ (1:1:1).
- 11.- Los estudios de elución de distintos aminoácidos a partir de las resinas cargadas nos han puesto de manifiesto los siguientes hechos:
Los mecanismos de elución no suponen una competitividad entre el aminoácido y los cloruros que coordinan al paladio. Sin embargo, esta elución viene condicionada por la competitividad entre el ion hidrógeno y el paladio por los aminoácidos correspondientes. Este efecto se pone de manifiesto en la utilización de eluyentes ácidos.
Por otro lado, la utilización del imidazol como eluyente implica un mecanismo de elución basado únicamente en la competitividad del ligando eluyente y el aminoácido correspondiente. Este hecho viene determinado por la elución de los aminoácidos en condiciones de acidez neutralizada.
La adsorción y elución de los aminoácidos han determinado las características químicas de un nuevo sistema IMAC con posibilidad de aplicaciones al tratamiento analítico de sistemas portadores de aminoácidos.

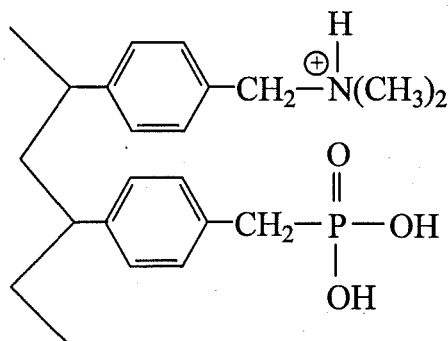
FE DE ERRATAS a la memoria "Estudio, Desarrollo y Caracterización de Resinas Quelatantes de Iones Metálicos. Aplicación en Sistemas de Impacto Ambiental y en el Desarrollo de Nuevos Métodos Cromatográficos", presentada por Sergi Díez.

Bellaterra, Septiembre, 1994.

- En la pág. 14, la molécula debe ser:



- En la pág. 49, línea 2, donde dice: *cationes como Ca y Mg* debe decir: *cationes como Ca²⁺ y Mg²⁺*.
- En la pág. 73, línea 3, donde dice: Figura 10, debería decir: Figura 11.
- En la pág. 81, línea 1, donde dice: *Substituyendo (24) en (25)*, debería decir *Substituyendo (26) en (25)*.
- En la pág. 85, en la **Tabla VIII**, columna 3, debe decir: Capacidad en Tampón (pH 4,5)
- En la pág. 105 el producto de la síntesis 4 debe ser:



- En la pág. 107 la expresión de la determinación de la acidez total debe ser:

$$Tot(OH^-) = \frac{(V_{NaOH} \cdot C_{NaOH}) - 4(V_{HCl} \cdot C_{HCl})}{g \text{ resina seca}}$$

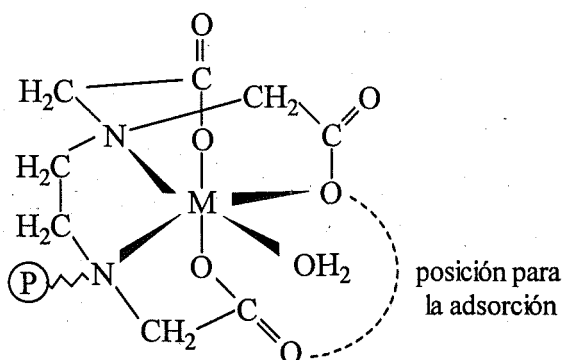
- En la pág. 116, el texto de la Tabla IV dice: "... $\pm 0,01\%$ respecto al tanto por ciento en sólido, $\pm 0,2$ mequiv OH/g resina, $\pm 0,1$ mequiv P/g resina, y $0,2$ mequiv N/g resina" y debería decir "... ~~$\pm 0,01\%$ respecto al tanto por ciento en sólido~~, $\pm 0,02$ mequiv OH/g resina, $\pm 0,01$ mequiv P/g resina, $\pm 0,02$ mequiv Cl/g resina y $\pm 0,02$ mequiv N/g resina".
- En las pág. 119, 120, 121 y 122, el texto de las Tablas V, VI, VII y VIII dice: "... imprecisión de $\pm 0,001$ y debería decir "... imprecisión de $\pm 0,0001$ ".
- En la pág. 124 la **Tabla IX** debe ser:

Resina	KILET		GRÁFICAMENTE	
	SD1	SD3	SD1	SD3
$K_{Cu} (s^{-1})$	$(1,8 \pm 0,1)10^{-3}$	$(2,1 \pm 0,2)10^{-3}$	$(2,2 \pm 0,2)10^{-3}$	$(2,8 \pm 0,2)10^{-3}$
$K_{Zn} (s^{-1})$	$(3,3 \pm 0,1)10^{-3}$	$(4 \pm 0,1)10^{-3}$	$(3,2 \pm 0,1)10^{-3}$	$(4 \pm 0,1)10^{-3}$

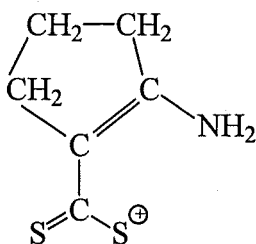
- En la pág. 126 la **Tabla X** debe ser:

Resina	SD12	SD16
$K_{Cu} (s^{-1})$	$K_1 (5 \pm 1)10^{-4}$ $K_{-1} (9 \pm 2)10^{-4}$	-----
$K_{Zn} (s^{-1})$	$K_1 (6 \pm 1)10^{-4}$ $K_{-1} (5 \pm 1)10^{-4}$	$(1,4 \pm 0,1)10^{-7}$

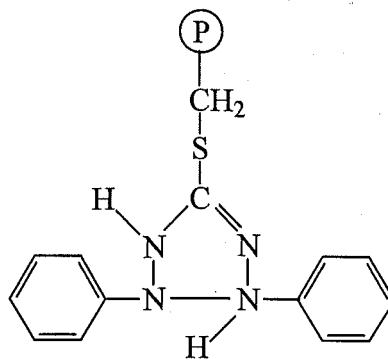
- En la pág. 142, el complejo formado por el polímero TED con un ion hexacoordinado ha de tener la estructura siguiente



- En la pág. 149, las moléculas **15** y **17** (P-D) deben ser:



15



17 (P·D)

- En la pág. 179 la ecuación (2) debería ser:

$$K = \frac{[PdCl_2(Oxn)^-]}{[PdCl_4^{2-}] [H_2(Oxn)^+]} = \frac{K_1}{[H^+]^2 [Cl^-]^2} \quad (2)$$

- En la pág. 212, última línea, donde dice: *capacidad máxima de adsorción de 0,655 moles por gramo de resina* debería decir: *0,655 mmoles por gramo de resina*.