



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN INGENIERIA

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTAMPADO MOLECULAR DE GLUCOSA"

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INGENIERIA**

INGENIERÍA QUÍMICA – BIOINGENIERÍA

P R E S E N T A :

**I. Q. ALBERTO LÓPEZ LUNA**

TUTOR:

**DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA**



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente:	Dr. Francisco López Serrano	Facultad de Química, UNAM
Secretario:	M.C. Marco A. Uresti Maldonado	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dr. Alberto Coronel Tecante	Facultad de Química, UNAM
1er. Suplente:	Dr. Sergio Huerta Ochoa	UAM – Iztapalapa
2do. Suplente:	Dr. Rafael Herrera Najera	Facultad de Química, UNAM

### **Sitio donde se desarrolló el tema:**

Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 314, Edificio E.  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

---

Dr. Eduardo Bárzana G.  
Asesor del tema

---

I.Q. Alberto López L.  
Sustentante

## DEDICATORIAS

### **A Dios:**

*Por haberme dado la vida y permitirme estar en este mundo, por levantarme cuando ya no he tenido ánimos para seguir adelante.*

### **A mis Padres:**

*Por haberme criado y guiado durante todos estos años con su ejemplo, y sobre todo por estar siempre conmigo.*

### **A mis Hermanos:**

*Por su cariño y por todos los momentos que hemos compartido juntos en la buenas y en la malas.*

### **A mis Sobrinas:**

*Por formar parte de mi vida.*

### **A mis Cuñadas y Cuñado:**

*Por su amistad.*

### **A mi madrina Alicia:**

*Donde quiera que estés te recuerdo con cariño.*

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.**

**Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Laboratorio 314,  
Universidad Nacional Autónoma de México** por la facilidades otorgada para la  
realización de este trabajo.

**Dr. Eduardo Bárzana García.**

*Gracias por su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo, por su paciencia,  
confianza y amistad. Sin su apoyo no habría sido posible todo esto.*

**M.C. Marco Antonio Uresti M.**

*Por sus asesorías y por los materiales proporcionados para la realización de este trabajo.*

**Dr. Francisco López Serrano**

*Por sus asesorías y por los materiales proporcionados para la realización de este trabajo.*

**Dr. Miquel Gimeno Seco**

*Por tu gran ayuda con tus sugerencias y correcciones de redacción.*

**LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA CONJUNTO E, EDIFICIO  
DE INGENIERÍA QUÍMICA, PB, UNAM**

**I.Q. Rafael Iván Puente Lee**

*Por las facilidades otorgadas para la realización de las microscopias de barrido  
electrónico.*

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES, UNAM**

**Q. Miguel Angel Canseco**

*Por las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas térmicas.*

**USAI, LABORATORIO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO, EDIFICIO B,  
PB, POSGRADO, UNAM**

**Q. Marisela Patricia Gutiérrez Franco**

*Por las facilidades otorgadas en la realización de las pruebas de espectroscopia  
infrarroja.*

**CONJUNTO E, EDIFICIO DE INGENIERÍA QUÍMICA, 2DO. PISO,  
LABORATORIO 222, UNAM**

**Dra. Tatiana E. Klimova Berestneva**

*Por las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas de porosimetría.*

**UNIDAD DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, INSTITUTO DE FISILOGIA  
CELULAR, UNAM**

**Biol. Rosa María Picaso Hernández**

*Por las facilidades otorgadas para la realización de las microscopías de transmisión  
electrónica*

*A todos mis compañeros y compañeras del Laboratorio 314 de Alimentos  
y Biotecnología por su ayuda y sobre todo por su amistad*

**ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>

**CAPÍTULO I****INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

<b>1.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 OBJETIVO.....</b>	<b>6</b>

**CAPÍTULO II****ANTECEDENTES**

<b>2.1 EL ESTAMPADO MOLECULAR.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 ASPECTOS TEÓRICOS</b>	
<b>2.2.1 Síntesis.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1.1 Molécula a estampar.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1.2 Monómero(s) funcional(es).....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.1.3 Agente(s) entrecruzante(s).....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1.4 Disolvente (porógeno).....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1.5 Condiciones de reacción (tipo de iniciación y métodos de polimerización).....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1.6 Polimerización por precipitación.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 SEPARACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 ESTAMPADO MOLECULAR DE CAROHIDRATOS.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.1 Estampado molecular de glucosa y fructosa.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4.1.1 Estructura y propiedades.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.1.2 Síntesis.....</b>	<b>33</b>
<b>2.4.1.3 Procedimiento general para la síntesis de MIPs.....</b>	<b>35</b>

<b>2.5</b>	<b>CARACTERIZACIÓN.....</b>	<b>36</b>
2.5.1	Caracterización química.....	36
2.5.2	Caracterización morfológica.....	37
2.5.3	Caracterización del comportamiento de reconocimiento molecular.....	39
2.5.4	Propiedades de los polímeros estampados molecularmente...	39
2.5.5	Aplicaciones potenciales.....	40

## **CAPÍTULO III**

### **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

<b>3.1</b>	<b>DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>MEDICIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>TÉCNICA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b>CARACTERIZACIÓN</b>	
3.5.1	Propiedades químicas	
3.5.1.1	Espectroscopía Infrarrojo.....	49
3.5.1.2	Análisis térmico DCS (calorimetría diferencial de barrido).....	49
3.5.2	Morfología	
3.5.2.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	50
3.5.2.2	Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	50
3.5.2.3	Porosimetría por sorción de nitrógeno.....	51
3.5.2.4	% en gel y grado de entrecruzamiento.....	51
3.5.3	Reconocimiento molecular	
3.5.3.1	Capacidad de enlace y selectividad.....	52
3.5.3.2	Cinética de enlace.....	53

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<b>4.1</b>	<b>SÍNTESIS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>ESPECTROS IR.....</b>	<b>59</b>



4.3	TERMOGRAMAS DSC.....	61
4.4	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM) y POROSIMETRÍA POR SORCIÓN DE NITRÓGENO.....	63
4.5	% EN GEL Y GRADO DE ENTRECruzAMIENTO.....	66
4.6	CAPACIDAD DE ENLACE, SELECTIVIDAD Y CINÉTICA DE ENLACE.....	70
	4.6.1 Capacidad de enlace de los MIPs sintetizados.....	71
	4.6.2 Cinética de enlace.....	75
	CONCLUSIONES.....	82
	BIBLIOGRAFÍA.....	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Monómeros comúnmente usados en la preparación de polímeros estampados.....	12
Tabla 2.2	Entrecruzantes comúnmente usados en la preparación de polímeros estampados.....	15
Tabla 2.3	Comparación de los métodos de polimerización para preparar partículas poliméricas estampadas molecularmente.....	19
Tabla 2.4	Ejemplos de las condiciones típicas para la separación de monosacáridos por HPLC .....	24
Tabla 2.5	Capacidad de enlace del hidrogel entrecruzado con EDGE en mg de azúcar / g de polímero.....	27
Tabla 2.6	Capacidad de enlace del hidrogel entrecruzado con EPI en mg de azúcar / g de polímero seco.....	27
Tabla 2.7	Capacidad de enlace del hidrogel entrecruzado con GDE en mg de azúcar / g de polímero seco.....	27
Tabla 2.8	Selectividad de enlace del hidrogel entrecruzado con EPI en mg de azúcar / g de polímero seco.....	28
Tabla 2.9	Capacidad de enlace del hidrogel Acrilamida-PEG200DMA en mg de azúcar / g de polímero.....	29
Tabla 2.10	Reactividades relativas de los monómeros a emplear.....	34
Tabla 3.1	Preparación de las microesferas estampadas molecularmente.	47
Tabla 3.2	Parámetros de solubilidad de los solventes empleados.....	52
Tabla 4.1	Síntesis y lavado de los polímeros estampados molecularmente con glucosa.....	58
Tabla 4.2	Fracción soluble e insoluble de los polímeros sintetizados.....	66

Tabla 4.3	Constantes utilizadas para calcular en grado de entrecruzamiento.....	68
Tabla 4.4	Grado de entrecruzamiento de los polímeros sintetizados.....	69
Tabla 4.5	Capacidad de enlace (mg de azúcar enlazada/g de polímero seco).....	72
Tabla 4.6	Selectividad de enlace de los polímeros sintetizados.....	73
Tabla 4.7	Azúcar enlazada a las 4.5 h de incubación.....	75
Tabla 4.8	Azúcar enlazada a las 4.5 h de incubación.....	78
Tabla 4.9	Eficiencia de Reenlace.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Representación esquemática del proceso de estampado molecular.....	8
Figura 2.2	a) Partículas irregulares de un monolito polimérico molido y tamizado obtenido por polimerización en solución, b) microesfera obtenida por polimerización en suspensión.....	18
Figura 2.3	Microesferas poliméricas obtenidas mediante polimerización por precipitación.....	20
Figura 2.4	Porosidades formadas por los espacios entre las partículas poliméricas.....	21
Figura 2.5	Representación esquemática del procedimiento de estampado y remoción.....	26
Figura 2.6	Cinética de enlace del hidrogel estampado con GPS y entrecruzado con EDGE.....	28
Figura 2.7	Cinética de enlace de la D-glucosa estudiado en agua, copolímero de Acrilamida-PEG200DMA.....	30
Figura 2.8	Enlace covalente de la fructosa con el ácido bórico contenido en el monómero.....	30
Figura 2.9	Cambio en la intensidad de fluorescencia del polímero estampado con D-fructosa vs concentración de azúcar ( $\lambda_{ex}$ , 370 nm; $\lambda_{em}$ , 426 nm).....	31
Figura 2.10	Representación espacial de las formas de la glucosa y fructosa, y de la condensación de ambas para formar sacarosa.....	32
Figura 2.11	Monómeros utilizados para el estampado molecular de glucosa.....	33
Figura 2.12	Software utilizado en la simulación de la copolimerización entre la acrilamida y el etilenglicol dimetacrilato.....	35

Figura 2.13	Discriminación entre moléculas estructuralmente similares.....	41
Figura 2.14	Diseño de una hidrolasa artificial mediante estampado molecular.....	42
Figura 2.15	Diseño de un biosensor donde el receptor es un polímero estampado molecularmente.....	43
Figura 3.1	Equipo utilizado para realizar el estampado de glucosa.....	45
Figura 3.2	Equipo utilizado para determinar la concentración de glucosa y fructosa.....	46
Figura 3.3	Extracción de la plantilla mediante el método soxhlet.....	48
Figura 4.1	Modelo idealizado del proceso de estampado molecular de la glucosa.....	55
Figura 4.2	Apariencia de los solventes después del lavado de los polímeros .....	57
Figura 4.3	Cantidad de glucosa removida utilizando diferentes solventes..	58
Figura 4.4	Cantidad de glucosa en los diferentes pasos de la síntesis.....	59
Figura 4.5	Espectro IR: I Acrilamida, II Etilenglicol dimetacrilato, III Polímero control y IV Polímero estampado.....	60
Figura 4.6	Termograma DSC: I Poli(acrilamida), II Poli(etilenglicol dimetacrilato), III Poli(acrilamida-co-etilenglicol dimetacrilato)...	62
Figura 4.7	Micrografía SEM de la microesferas MIP sintetizadas.....	63
Figura 4.8	Micrografía SEM de una microesfera MIP aislada... ..	63
Figura 4.9	Micrografía TEM de las microesferas MIP sintetizadas.....	64
Figura 4.10	Distribución de tamaños de poro de las microesferas MIP sintetizadas.....	65
Figura 4.11	Fracción soluble e insoluble de los polímeros sintetizados....	67
Figura 4.12	Grado de entrecruzamiento de los polímeros sintetizados.....	69

Figura 4.13	Rotor de tubos utilizado en el proceso de incubación.....	70
Figura 4.14	Cromatograma de los azúcares que quedaron en el sobrenadante después de la incubación.....	71
Figura 4.15	Capacidad de enlace de los polímeros.....	72
Figura 4.16	Selectividad de los polímeros.....	73
Figura 4.17	a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos b) mg de azúcar enlazada a diferentes tiempos, polímero control 1.....	76
Figura 4.18	a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos b) mg de azúcar enlazada a diferentes tiempos, MIP 1.....	76
Figura 4.19	a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos b) mg de azúcar enlazada a diferentes tiempos, polímero control 2.....	77
Figura 4.20	a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos b) mg de azúcar enlazada a diferentes tiempos, MIP 2.....	77
Figura 4.21	a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos b) mg de azúcar reenlazada a diferentes tiempos, polímero control 1.....	79
Figura 4.22	a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos b) mg de azúcar reenlazada a diferentes tiempos, MIP 1.....	79
Figura 4.23	a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos b) mg de azúcar reenlazada a diferentes tiempos, polímero control 2.....	80
Figura 4.24	a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos b) mg de azúcar reenlazada a diferentes tiempos, MIP 2.....	80

## **Resumen**

Los polímeros estampados molecularmente (MIP), para el reconocimiento específico de moléculas han sido sintetizados en diferentes configuraciones incluyendo partículas esféricas, monolitos porosos, hidrogeles y membranas de acuerdo con la aplicación final que se les dé. La mayoría de los MIPs son partículas de forma irregular obtenidas a partir del cribado o molienda de monolitos poliméricos macroporosos o hidrogeles. En este trabajo se presenta un método fácil y versátil para el estampado molecular no covalente al utilizar un monómero apropiado junto con glucosa para producir un polímero estampado molecularmente (MIP).

El MIP fué sintetizado mediante polimerización en solución de acrilamida (AAM) con etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como agente entrecruzante y azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador de radicales libres, para dar microesferas de tamaño muy homogéneo, la plantilla (glucosa) fue fácilmente removida con agua. Los estudios de equilibrio utilizando diferentes microesferas MIP y NIPs (polímeros no estampados molecularmente o polímeros control) fueron realizados en una solución acuosa de acetonitrilo (MeCN) y agua para determinar la capacidad de enlace y selectividad isomérica con respecto a la glucosa y fructosa. Los MIPs sintetizados mostraron capacidades de enlace con una afinidad del 97% para la glucosa en una mezcla de ambos azúcares. En este estudio se reporta un método fácil que consiste en colocar a la glucosa en presencia de acrilamida para formar una plantilla molecular la cual es fijada con etilenglicol dimetacrilato, posteriormente la glucosa es removida dejando una cavidad complementaria en forma y funcionalidad a la glucosa obteniéndose así un MIP con un marcado reconocimiento y selectividad para la molécula de glucosa al ser colocados en una solución acuosa con una mezcla de glucosa y fructosa en un enlace competitivo.

**Abstract**

Molecularly imprinted polymers MIP for recognition of target molecules have been synthesized in many configurations including polymer beads, porous monoliths, hydrogels or membranes according to their final application. Most of the MIPs are based on irregular shaped particles obtained by grinding or sieving the macro-porous polymer monolith or hydrogel films. Herein we present an facile and versatile way to non-covalent molecular imprinting of an appropriate monomer with glucose to produce molecularly imprinted polymers (MIP).

The MIPs were synthesized by solution polymerisation of acrylamide (AAM) with ethylene glycol dimetacrylate (EGDMA) as cross-linking agent and azobisisobutyronitrile (AIBN) as free-radical initiator to yield very homogeneous micro-spheres and the template was easily removed with water. Batch equilibration studies using different MIP micro-spheres and non-molecularly imprinted control polymers (NIPs) were performed in aqueous acetonitrile (MeCN) and water solution to determine the binding capacities and isomeric selectivity with respect to glucose and fructose. The synthesized MIP exhibited binding capacities with up to 97% more affinity for glucose in a mixture of both sugars. This study gives an easy method consist in a print molecule (glucose) is used to guide the assembly of functional monomers (acrylamide). Ethylene glycol dimethacrylate is then employed to fix the pre-assembled binding groups around the print molecule. Following removal of the print molecule (glucose), the polymer revealed binding groups within a defined cavity for the original print molecule, obtained a MIP with a remarkable and selective bio-mimetic recognition of the glucose molecule at be placed a known amount of the template solution (glucose and fructose) in competitive binding studies.



# CAPÍTULO I

## 1.1- INTRODUCCIÓN

En los procesos industriales que involucran el uso de edulcorantes, como en la industria de bebidas refrescantes o de alimentos, entre otros, ha crecido el uso de jarabes de alta fructosa<sup>1</sup>. Esto es debido a que la fructosa tiene un poder edulcorante mucho mayor que la sacarosa (azúcar común) y la glucosa, además de auxiliar en el tratamiento de la diabetes como sustituto del azúcar. En el proceso de elaboración de jarabes de alta fructosa, la glucosa es transformada en fructosa por la enzima glucosa isomerasa dentro de un bioreactor y posteriormente se utiliza cromatografía de líquidos para separar el producto resultante en un proceso cíclico obteniéndose una corriente enriquecida con fructosa y otra enriquecida con glucosa, la cual es regresada al bioreactor<sup>2, 3, 4</sup>. La técnica del estampado molecular está basada en el diseño de una red polimérica capaz de reconocer una molécula específica en presencia de otras, las cuales podrían ser muy similares en su estructura<sup>7</sup>. Entre la comunidad científica y el sector industrial ha aumentado el interés por esta técnica ya que ofrece una manera fácil y eficiente de purificar o aislar productos en relación a otros métodos convencionales<sup>50</sup>.

Debido a esto el estampado molecular es una técnica de creciente interés, enfocada a la preparación y el diseño de materiales para el reconocimiento molecular. La síntesis de la matriz polimérica se da principalmente a partir de monómeros funcionales, agentes entrecruzantes y el compuesto a estampar a modo de "plantilla molecular". La interacción no covalente entre el monómero y la "plantilla" previa a la polimerización, y la posterior extracción de ésta del polímero formado, da como resultado la formación de una matriz con cavidades creadas por

la molécula "plantilla"<sup>11</sup>. El material resultante tiene la propiedad de retener mediante adsorción selectiva esa misma "plantilla" o molécula estampada.

Esta metodología permite construir receptores activos en estructuras poliméricas muy estables y resistentes a condiciones drásticas de operación, lo cual representa una mejora notable respecto a otros procesos de purificación<sup>49</sup>, como los de extracción o fraccionamiento los cuales utilizan disolventes orgánicos volátiles o costosos procesos de purificación.

Entre las metodologías y materiales reportados, aquellos basados en matrices poliméricas formadas por micro o nano-esferas porosas, son los que ofrecen mayor eficacia y versatilidad en la separación o reconocimiento selectivo de ciertas moléculas debido a su forma y a su alta área superficial<sup>34</sup>. Otras metodologías incluyen monolitos o hidrogeles cuyas partículas son producidas de forma irregular por molienda o cribado de los materiales sintetizados. Esto provoca que el flujo de materiales o la superficie de adsorción al ser empacadas en columnas de separación de fase estacionaria se vea disminuido<sup>30</sup>. Una alternativa consiste en sintetizar los materiales en moldes de acuerdo a su aplicación final, la mayoría de los MIPs se han sintetizado a partir de esta última vía<sup>32</sup>. En cambio, la síntesis de partículas esféricas de tamaño pequeño y uniforme resuelve este problema de aplicación ya que éstas pueden ser ubicadas en cualquier espacio y además su forma ofrece una alta superficie de contacto<sup>31</sup>.

Este trabajo, presenta una manera fácil y versátil para el estampado molecular no covalente de un monómero con glucosa para producir polímeros estampados molecularmente (MIP). El MIP fue sintetizado mediante polimerización en solución por radicales libres de acrilamida (AAM) con etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como agente entrecruzante, y se utilizó glucosa como plantilla (molde) para obtener micro-esferas de tamaño homogéneo con cavidades complementarias en forma y funcionalidad a la molécula de glucosa. La plantilla fue removida con agua. En los estudios de adsorción se usaron micro esferas MIP con diferente

cantidad de entrecruzante y polímeros no estampados como control (NIPs). Las cuales se colocaron en soluciones acuosas de acetonitrilo (MeCN) y otras de agua pura para determinar las capacidades de enlace y selectividades isoméricas de la glucosa con respecto a la fructosa al medir del sobrenadante la cantidad de ambos azúcares por HPLC y por diferencia obtener la cantidad de azúcar enlazada. Los MIP sintetizados exhibieron capacidades con una afinidad de 60 y 93 % (MIP 1 y MIP 2 respectivamente) para glucosa en una mezcla de ambos azúcares (glucosa y fructosa) en una solución acuosa de MeCN (85% acetonitrilo/15% agua, v/v); sin embargo no mostraron ningún tipo de enlace en la solución de agua pura, por lo que en este trabajo solo se muestran los resultados obtenidos en la solución acuosa de acetonitrilo (MeCN). Estas micro esferas MIP son ideales como fase estacionaria en columnas de separación, aunque otra aplicación sería en la elaboración de biosensores, por ejemplo para el control de la diabetes<sup>36</sup>.

### **1.2- OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo fue diseñar y sintetizar un polímero capaz de enlazar glucosa preferentemente, mediante el estudio de las diferentes variables que intervienen en el estampado molecular, y que en un momento dado pueda ser aplicado en la separación de una mezcla de glucosa / fructosa, obtenida de un reactor industrial de isomerización enzimática, esto mediante la evaluación de la capacidad de enlace y selectividad del polímero con pruebas de enlace competitivo de ambos azúcares.

#### ***Objetivos particulares:***

- Establecimiento de las condiciones de polimerización
- Evaluación de las propiedades químicas, morfológicas y de reconocimiento molecular de los MIPs sintetizados mediante: espectroscopia infrarroja, calorimetría diferencial de barrido, microscopia electrónica, microscopia de transmisión, porosimetría de nitrógeno, grado de entrecruzamiento y pruebas de enlace competitivo.

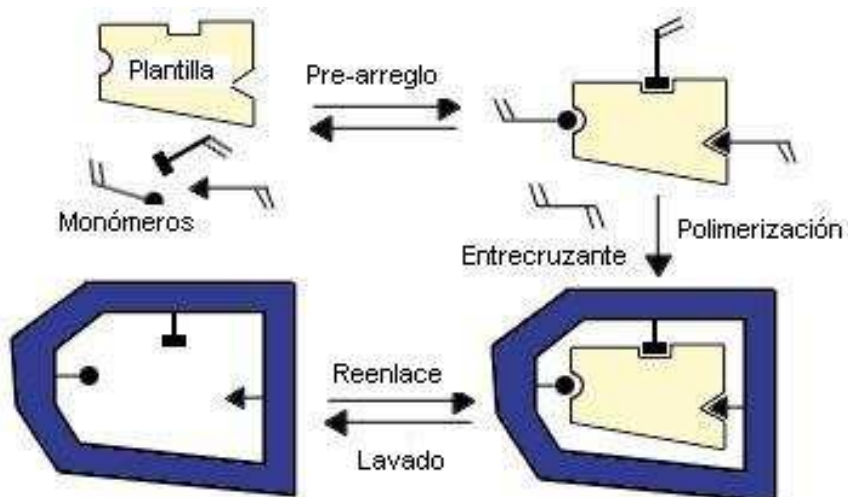
## **CAPÍTULO II**

### **ANTECEDENTES**

La investigación basada en el estampado molecular está enfocada principalmente a desarrollar nuevos métodos para la síntesis de polímeros con afinidad a compuestos de interés. Los trabajos reportados se han realizado tanto por bioquímicos, como químicos analíticos y/o poliméricos.<sup>5</sup> Su complejidad involucra al tipo y modo en que una molécula pueda ser estampada de la forma más efectiva posible y motiva a los investigadores a adentrarse de forma empírica a la obtención de los nuevos materiales. Aunque es verdad que la síntesis de los polímeros es una actividad que involucra múltiples variables, a menudo interdependientes, un buen entendimiento de los fundamentos del equilibrio químico, teoría del reconocimiento molecular, termodinámica y química de polímeros, son una poderosa herramienta en la síntesis.<sup>6</sup>

#### **2.1- EL ESTAMPADO MOLECULAR**

En el proceso de estampado molecular, la plantilla molecular (molécula a estampar) interacciona con los monómeros funcionales; éstos a su vez, son entrecruzados químicamente por copolimerización con un monómero entrecruzante dando un **Polímero Estampado Molecularmente (MIP)** por sus siglas en inglés (**Molecular Imprinting Polymer**). Este proceso resulta en una matriz polimérica rígida con la plantilla encajada o adsorbida dentro de dicha matriz. La remoción de la plantilla revela sitios de reconocimiento específicos para la plantilla y/o sus análogos mas cercanos (**Figura 2.1**).<sup>7, 8</sup>



**Fig. 2.1** Representación esquemática del proceso de estampado molecular. El pre-arreglo de los monómeros funcionales es conducido por sus interacciones complementarias con la plantilla (molécula a estampar). La copolimerización con un entrecruzante 'fija' a los grupos funcionales para formar un molde definido 'cavidad'. Al remover la plantilla por extracción con solventes o por ruptura química produce sitios de enlace específicos para la platilla original basado en la posición de los grupos funcionales y forma de la cavidad.

El inicio de esta área de investigación arrancó en el campo de la inmunología con Breinl y Haurowitz hace mas de 60 años, y el desarrollo de la técnica como tal fue reportada por Wulff y Mosbach respectivamente.<sup>9</sup> Actualmente, existen dos rutas principales utilizadas en el estampado molecular.<sup>7,</sup>  
<sup>10, 11</sup> La primera fue desarrollada principalmente por Wulff y colaboradores, donde la unión de los monómeros funcionales y la plantilla en la solución previo a la polimerización, son mantenidos por enlaces covalentes (reversibles). La segunda fue desarrollada por Mosbach y colaboradores, en donde la unión entre la molécula a estampar y los monómeros funcionales son mantenidos por interacciones de coordinación metálica o no-covalente. Éste último estampado no covalente tiene un mayor potencial<sup>19</sup> debido a que un gran número de compuestos, incluyendo a los biológicos, son capaces de interactuar de forma no covalente con los monómeros, y a su vez, estas interacciones son reversibles. En cambio, las interacciones covalentes reversibles con los monómeros son poco frecuentes y a menudo requieren de un proceso agresivo como puede ser una hidrólisis ácida

para romper los enlaces covalentes entre la plantilla y el monómero funcional. Debido a esto, la mayoría de los estudios en estampado molecular se han enfocado en la síntesis de polímeros estampados a partir de la interacción no covalente de la plantilla y monómero, ya sea entrecruzando un monómero funcionalizado existente, o bien utilizando un polímero capaz de adsorber a la molécula plantilla y entrecruzándolo posteriormente, lo cual simplifica la síntesis de los MIPS.<sup>12</sup>

## **2.2- ASPECTOS TEÓRICOS**

### **2.2.1- Síntesis**

Las variables más importantes que controlan el proceso de estampado son descritas a continuación:<sup>13</sup>

- Molécula a Estampar
- Monómero(s) Funcional(es)
- Agente(s) Entrecruzante(s)
- Disolvente(s) (Porogeno)
- Condiciones de Reacción (Método de Polimerización y Tipo de Iniciación)

#### **2.2.1.1 Molécula a Estampar**

En todo proceso de estampado molecular la plantilla es de importancia crucial, ésta es la que dirige la organización de los monómeros funcionales. Desafortunadamente, y por varias razones, no todas la plantillas son tan fáciles de estampar. En términos de compatibilidad con la polimerización por radicales libres, la plantilla idealmente debe ser químicamente inerte bajo las condiciones de polimerización, por lo que otras alternativas de estampado deben ser buscadas cuando la plantilla pueda participar en la reacción, o es inestable bajo dichas condiciones (temperatura, luz UV, agitación, etc.)<sup>5, 14, 15, 16, 17</sup>

### 2.2.1.2 Monómero(s) Funcional(es)

Los monómeros funcionales son los responsables de las interacciones en los sitios estampados, las interacciones no covalentes incluyen puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas o enlaces de coordinación y/o van der Waals. Las interacciones monómero-plantilla deben ser complementarias (ej. enlace-H donador con enlace-H aceptor) para maximizar la formación del complejo.<sup>5</sup> Los puentes de hidrógeno muestran bajas constantes de asociación, ej.  $K_{\text{ass}}=1.7 \text{ M}^{-1}$ , aún en solventes no polares como  $\text{CCL}_4$ . La situación se vuelve mas problemática ya que estos valores disminuyen considerablemente a altas temperaturas ( $60^\circ\text{C}$ ). También es posible la interacción de los monómeros con otros constituyentes de la mezcla de polimerización como son los agentes entrecruzantes dando lugar a un estampado deficiente.<sup>18</sup> Según datos reportados, más del 90% del complejo monómero-plantilla se forma cuando la constante de asociación es alrededor de  $K_{\text{ass}} > 900 \text{ M}^{-1}$ .<sup>19</sup>

Las interacciones quelantes con metales de coordinación son relativamente más fuertes que los enlaces de hidrógeno, especialmente en agua, y por lo tanto pueden reducir la incorporación al azar de los monómeros funcionales. La fuerza y cinética de enlace puede ser optimizada, por la elección del ión metálico, el cual puede ser sustituido fácilmente una vez que la adsorción ha tenido lugar.<sup>20, 21</sup>

En general, las interacciones monómero-plantilla están gobernadas por un proceso de equilibrio entre la plantilla, los monómero(s) libre(s) y su correspondiente complejo que depende de la temperatura, la presión, y la concentración. A bajas temperaturas las interacciones electrostáticas son favorecidas. Sin embargo, algunos autores han producido polímeros con un buen desempeño a elevadas temperaturas ( $120^\circ\text{C}$ ).<sup>18</sup>

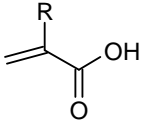
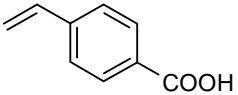
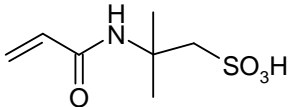
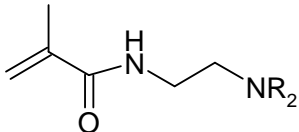
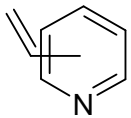
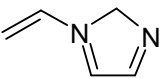
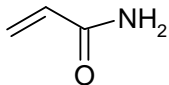
Por otro lado, también se utiliza un exceso de monómero para desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo monómero-plantilla. Sin embargo el exceso de monómero libre conduce a la formación de sitios de enlace no específicos.<sup>22</sup> Además se ha encontrado que solamente el 15% de las cavidades



libres muestran recaptación de la plantilla, y el 85% restante no es activo en separaciones o catálisis. Esto puede deberse a un encogimiento en la mayoría de las cavidades, por consiguiente, tales MIPs no son óptimos para separaciones preparativas o para investigaciones en catálisis.<sup>9, 19</sup>

Cuando se utiliza más de un monómero funcional es importante conocer las reactividades relativas de los monómeros así como la del entrecruzante para evaluar la efectividad de la co-polimerización. Monómeros funcionales con diferentes estructuras químicas y polaridades están comercialmente disponibles y muchos más pueden ser diseñados vía síntesis. En la Tabla 2.1 están las estructuras químicas de una selección de los monómeros funcionales más importantes.<sup>5</sup>

**Tabla 2.1.** Monómeros comúnmente usados en la preparación de polímeros estampados

Monómeros Funcionales	Tipo de Interacción
<b>Ácidos</b>	
	<p>Ácidos Acrílicos (R=H, CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>COOH)</p> <p>Cargas Iónicas Enlaces de Hidrógeno</p>
	<p>Ácidos Vinilbenzoicos</p> <p>Cargas Iónicas, Enlaces de Hidrógeno</p>
	<p>Ácidos Acrilamidossulfónicos</p> <p>Cargas Iónicas</p>
<b>Básicos</b>	
	<p>Aminometacrilamidas (R=H<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)</p> <p>Cargas Iónicas</p>
	<p>Vinilpiridinas</p> <p>Cargas Iónicas Enlaces de Hidrógeno Transferencia de Carga</p>
	<p>Vinilimidazoles</p> <p>Cargas Iónicas Enlaces de Hidrógeno Coordinación metálica</p>
<b>Neutro</b>	
	<p>Acrilamidas</p> <p>Enlaces de Hidrógeno</p>

### 2.2.1.3 Agente(s) Entrecruzante(s)

En un polímero estampado el entrecruzante cumple tres principales funciones. La primera es el control de la morfología de la matriz polimérica (ej. tipo-gel, macroporoso, o microgel). Por otro lado éste sirve para fijar los sitios de enlace estampados. Por último y no menos importante, la naturaleza del agente entrecruzante imparte estabilidad mecánica a la matriz polimérica.

Desde el punto de vista de la síntesis de micro-partículas en polimerización en solución o por precipitación, generalmente se usan altas proporciones de entrecruzante, por lo que, comúnmente se emplean relaciones de entrecruzante mayores al 80%<sup>22</sup>. Por la misma razón, se deben tener en cuenta las reactividades relativas de los monómeros funcionales y el entrecruzante con tal de tener una incorporación uniforme de los monómeros. La reactividad relativa de los entrecruzantes debe ser parecida a la de los monómeros funcionales. Cuando las reactividades relativas de los entrecruzantes son desconocidas, se pueden hacer aproximaciones mediante los valores de estructuras análogas (ej. los valores tabulados para metil metacrilato son una guía útil para los valores del etilen glicol dimetacrilato)<sup>5</sup>. Aunque hay que tener en cuenta que los grupos vinílicos en monómeros multifuncionales podrían ser distintos químicamente, y por lo tanto con distintas reactividades relativas, por lo que los diferentes grupos vinílicos podrían ser incorporados a diferentes velocidades en el polímero.

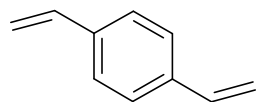
Para la creación de sitios de enlace, o cavidades, que, sean del tamaño, forma y estén adecuadamente funcionalizados para enlazar o permitir el paso de la molécula objetivo o su análogo, se requiere que la red polimérica tenga un peso molecular de entrecruzamiento adecuado para "encapsular" a la plantilla. En el caso en que la densidad de entrecruzamiento sea demasiado baja, la longitud efectiva entre puntos de entrecruzamientos puede ser demasiado grande y el estampado sería poco exitoso<sup>12</sup>. Esto crea una cavidad excesivamente grande y resulta en un estampado no específico. Una longitud efectiva entre puntos de entrecruzamiento muy pequeña puede dar una red que atrapa completamente a la

molécula estampada, debido a un tamaño de cavidad muy pequeño produciendo un MIP totalmente inservible.

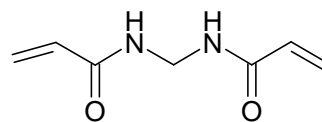
Por otro lado, debido a que el entrecruzante puede estar en íntimo contacto con la plantilla en la red del MIP, es probable que el entrecruzante juegue un papel clave en el establecimiento de la forma y dimensiones de las cavidades resultantes. Por lo tanto, la selección del tipo de agente entrecruzante afecta significativamente la obtención de estampados satisfactorios, y esto es importante en el diseño de un MIP.<sup>12</sup>

El etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) es el entrecruzante mas usado en sistemas con monómeros acrílicos, ya que éste provee estabilidad mecánica y térmica, y buena propiedad de mojado<sup>22</sup>. Solamente el trimetilpropano trimetacrilato ha mostrado un comportamiento similar, o incluso mejor que el EDGMA en el estampado de péptidos. En la Tabla 2.2 se muestran las estructuras moleculares de los entrecruzantes mas utilizados.<sup>10</sup>

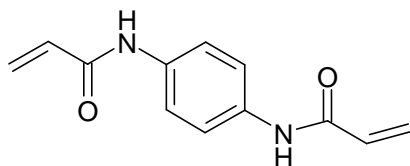
**Tabla 2.2** Entrecruzantes comúnmente usados en la preparación de polímeros estampados



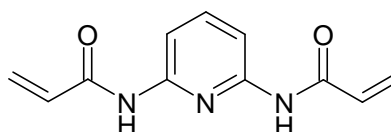
4- divinil benzeno



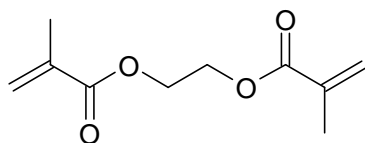
N,N'-metilen-bisacrilamida



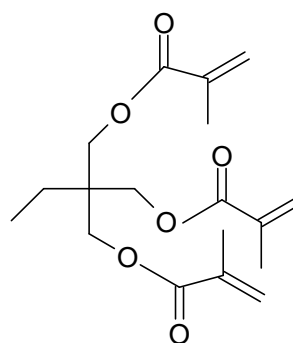
N,N'-fenilen-bisacrilamida



2,6-bisacrilamidopiridina



etilen glicol dimetacrilato



trimetilolpropano trimetacrilato

#### **2.2.1.4. Disolvente (Porógeno)**

El disolvente además de ser el medio de la reacción, tiene una segunda función, ya que interviene en la creación de poros en el polímero. Por esta razón es bastante común referirse al disolvente como “porógeno”; la naturaleza y cantidad de porógeno afecta la morfología y el volumen del poro formado en el material.<sup>5 23</sup>

En general, poca porosidad y/o poca área superficial dan un bajo reconocimiento de la plantilla debido al difícil acceso de la molécula plantilla hacia los sitios activos, evitando el reconocimiento de la molécula en estudio. Esto puede suceder incluso cuando se usa un disolvente capaz de estabilizar al complejo monómero-plantilla durante el paso de pre-polymerización, desafortunadamente es

bastante difícil la selección del disolvente correcto para un estampado exitoso y éste debe ser estudiado para cada caso.<sup>22</sup> Además de este papel dual como disolvente y como agente formador de poros en el material, el disolvente en un estampado no covalente debe favorecer la formación del complejo monómero-plantilla. Normalmente esto implica que los disolventes orgánicos apolares, no próticos, como el tolueno, son disolventes que estabilizan los puentes de hidrógeno<sup>5</sup>. Sin embargo cuando fuerzas hidrofóbicas rigen la complejación monómero-plantilla entonces el agua puede ser el disolvente a elegir,<sup>24</sup> si bien ha sido difícil adaptar a los MIPs a condiciones acuosas. Esto es en parte porque las interacciones específicas (polares) entre los sitios estampados y la molécula objetivo son debilitados, además porque las interacciones no específicas (hidrofóbicas) entre otras moléculas y la matriz polimérica se fortalecen.<sup>25, 26</sup>

El mayor problema que se plantea en el proceso del estampado molecular no covalente es la heterogeneidad de los sitios de enlace y las limitaciones morfológicas del polímero para la difusión. Al momento, no se han tenido grandes progresos en sistemas acuosos (polar, próticos) en comparación a los sistemas orgánicos (polar, no polar, no próticos) o mezcla de disolventes.<sup>27, 28</sup>

Otro punto a considerar es el proceso de hinchamiento del MIP al estar en contacto con un disolvente, lo cual puede afectar el reconocimiento, idealmente, la polimerización y caracterización deben ser realizados en el mismo disolvente. Se sabe que el porógeno y el método de iniciación afectan las propiedades físicas de los polímeros. Una de estas propiedades es el grado de polimerización, una ineficiente iniciación o el uso de un disolvente porogénico que pueda actuar como un agente de terminación de cadena, limitan la polimerización. El efecto más dramático en la calidad del polímero deseado según la elección del porógeno está en el área superficial creada y la distribución de tamaños de los poros en el material. Estas propiedades están directamente relacionadas con la solubilidad y el crecimiento de las cadenas poliméricas en el disolvente.<sup>29</sup>

### **2.2.1.5 Condiciones de Reacción (Tipo de Iniciación y Métodos de Polimerización)**

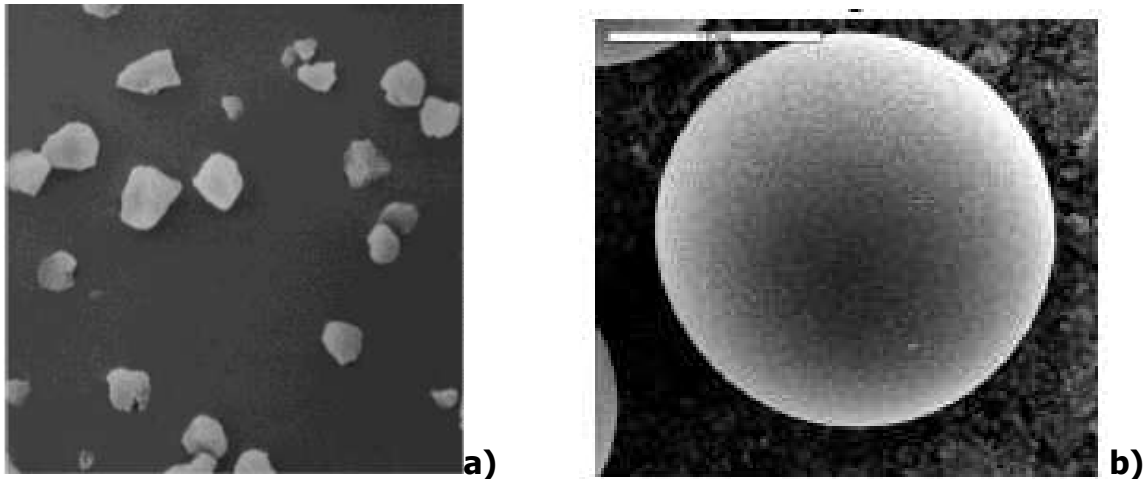
#### ***Tipo de Iniciación***

Existen diferentes tipos de iniciación en la polimerización por radicales libres y suele elegirse uno dependiendo del sistema. Por ejemplo, si la plantilla fuera foto- o térmicamente inestable entonces la iniciación puede ser activada fotoquímicamente o térmicamente, según sea el caso. Cuando la formación del complejo es por puentes de hidrógeno las polimerizaciones a bajas temperaturas son ideales, y bajo tales circunstancias se eligen iniciadores fotoquímicos que pueden operar bien a bajas temperaturas.<sup>5</sup> Sin embargo, tanto en la iniciación térmica como por UV se debe tener un buen control de la temperatura de polimerización para obtener una mayor reproducibilidad en los resultados.<sup>29</sup>

#### ***Métodos de Polimerización***

En muchos casos la alta especificidad es garantizada por el alto grado de entrecruzamiento de la estructura polimérica. Se ha reportado que por lo menos el 50% del monómero total en un sistema de ácido metacrílico (MAA) - etilen glicol dimetacrilato (EDMA) debe ser EDMA<sup>22</sup> de lo contrario el reconocimiento no se lleva a cabo. El método convencional para la preparación de MIPs consiste en la obtención de polímeros tipo gel o monolitos, que incluyen pasos de triturado y tamizado como última etapa del proceso. El proceso de cribado y tamizado consume tiempo y se obtienen solo cantidades moderadas de producto "útil".<sup>11</sup>

Los polímeros tipo-gel (hidrogel) no son muy atractivos para aplicaciones que involucran flujos a través de ellos por ejemplo en HPLC, debido a sus propiedades mecánicas relativamente pobres. Con respecto a los monolitos poliméricos, las partículas MIP son de forma irregular y no son ideales para propósitos de cromatografía (Fig. 2.2 a).<sup>29</sup>



**Fig. 2.2** a) Partículas irregulares de un monolito polimérico molido y tamizado obtenido por polimerización en solución, b) Microesfera obtenida por polimerización en suspensión.

Si bien la polimerización por suspensión o por semilla pueden proporcionar microesferas poliméricas estampadas (Fig. 2.2 b), estos requieren el uso de dispersantes o emulsificantes, que por lo general los hace métodos más complejos. Por estas razones y como objetivo principal de este trabajo, se requiere de un método más general aplicable a un amplio rango de moléculas, que produzca microesferas MIP uniformes.<sup>30</sup>

La tabla 2.3 muestra los diferentes métodos de polimerización que producen microesferas poliméricas y la distribución del tamaño de partícula.<sup>31</sup>



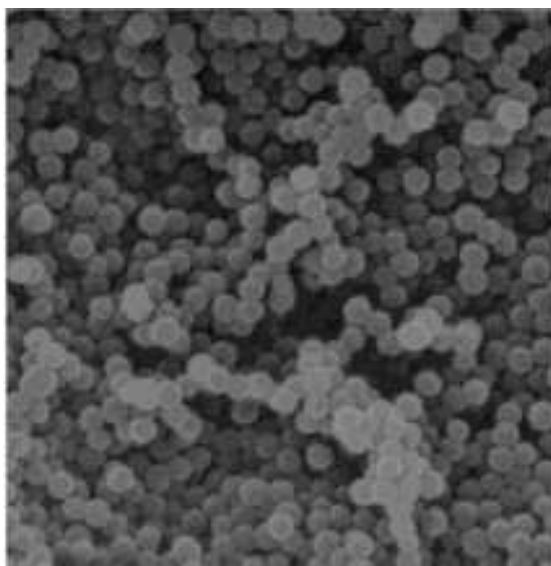
**Tabla 2.3** Comparación de los métodos de polimerización para preparar partículas poliméricas estampadas molecularmente

<b>Método</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Polimerización por suspensión normal  Polidispersidad Dp= 5µm-2mm	Polimerización por suspensión en una fase continua acuosa	Surfactantes convencionales pueden satisfacer la formación de partículas poliméricas que pueden ser usadas para columnas cromatográficas	No aplica para estampados que usan monómeros funcionales hidrofílicos
Polimerización por suspensión en perfluorocarbono  Polidispersidad Dp= 5µm-50µm	Polimerización por suspensión en una fase continua de perfluorocarbono	Aplicable a la mayoría de los sistemas de estampado, tamaño de partícula ajustable	Se necesitan surfactantes especiales
Polimerización por semilla  Monodisperso Dp= 2µm-50µm	Polimerización siguiendo multi-pasos de hinchamiento para partículas semilla	Cuentas poliméricas uniformes pueden ser obtenidas para columnas cromatográficas	Los pasos de hinchamiento son complicados, generalmente no es compatible para sistemas de estampado no-covalente
Polimerización por injerto  Monodisperso Dp= 50nm -1µm	Injerto de un capa de polímero estampado en una cuenta soporte	Compatibilidad general con el estampado molecular, partículas uniformes pueden ser obtenidas para columnas cromatográficas	Capacidad de carga y rendimiento del injerto bajos
Polimerización por surfactantes reactivos  Monodispersidad Dp= 30 nm-500nm	Entrecruzamiento de surfactantes funcionales usando polimerización por emulsión o suspensión	Emulsión estabilizada por surfactantes funcionales, no interfieren en el proceso de estampado	Se necesitan surfactante polimerizables especiales para la síntesis
Polimerización por precipitación  Polidispersidad Dp= 100nm-10µm	Polimerización y entrecruzamiento a partir de una solución diluida de monómero	Limpio, microesferas uniformes son generalmente obtenidas con buenos rendimientos, las microesferas son apropiadas para emplearse en columnas cromatográficas	Las condiciones del solvente necesitan ser ajustadas para minimizar el consumo de la molécula a estampar y maximizar las interacciones monómero-plantilla

Dp = Diámetro de Partícula

### 2.2.1.6 Polimerización por Precipitación

Se ha usado el método de polimerización por precipitación para preparar microesferas estampadas con diversas moléculas plantilla. Este método es fácil de realizar, y no requiere de los pasos de cribado y tamizado que consumen tiempo. Las condiciones de reacción son compatibles con el estampado molecular covalente y no covalente, las microesferas MIP pueden ser fácilmente suspendidas y dispersadas en los disolventes de prueba, y fácilmente recuperadas por simple centrifugación (Fig.2.3).<sup>7, 32, 33</sup>

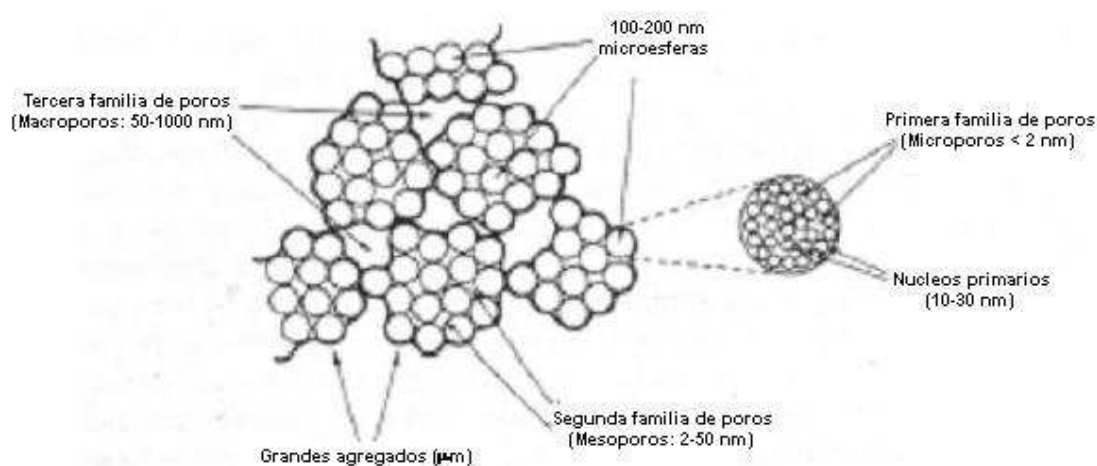


**Fig. 2.3** Microesferas poliméricas obtenidas mediante polimerización por precipitación.

En las condiciones de reacción de la polimerización por precipitación: altas relaciones de entrecruzante  $>20\%$  (definido como el porcentaje de entrecruzante con respecto al número total de moles de monómero) y altos volúmenes de disolvente, pequeños núcleos primarios se separan de la fase durante la polimerización, estos a su vez se aglomeran entre si fusionándose mediante enlaces intermoleculares de entrecruzamiento<sup>34</sup>, hay un punto crítico durante la polimerización, donde la red polimérica creciente no es lo suficientemente solvatado por la mezcla de monómero residual y/o porogeno, por lo que la matriz polimérica se separa de la fase del medio de polimerización precipitándose, dando lugar a microesferas poliméricas macroporosas o también conocidos como

microgeles. El término "macroporoso", que puede ser usado como sinónimo del término "macroreticular", se emplea para subrayar el hecho de que el polímero es poroso, pero esto no significa o implica nada acerca de los detalles morfológicos del polímero, ejemplo: el tamaño promedio de los poros o la distribución de tamaño de poro.<sup>35</sup>

Las porosidades surgen de los espacios entre estas partículas y pueden ser de diferentes tamaños (microporos < 2nm; 2 nm < mesoporos < 50nm; macroporos >50 nm) Fig. 2.4.



**Fig. 2.4** Porosidades formadas por los espacios entre las partículas poliméricas.

Bajo estas condiciones más diluidas las microesferas formadas, permanecen en un estado no agregado y son a menudo recuperados como polvo, bajo condiciones más concentradas (relaciones de entrecruzante >20% y bajos volúmenes de disolvente) estas normalmente se fusionan para formar monolitos poliméricos porosos<sup>30</sup> o forman polímeros tipo gel a relaciones de entrecruzante < 5%<sup>36</sup>.

Este método puede usarse para la síntesis de microesferas con sitios de enlace estampados molecularmente. Ya que aditivos como surfactantes o estabilizantes no son necesarios, la síntesis de microesferas MIP es fácil de hacer, y la modificación post-estampado de las microesferas para la introducción de

funcionalidades secundarias, que pueden servir para inmobilizaciones o conjugaciones específicas es posible<sup>31</sup>.

### ***Procedimientos Generales de Polimerización***

La mayoría de los monómeros comerciales, especialmente los líquidos, están mezclados con inhibidores de polimerización para evitar la polimerización en anaquel. Sin embargo, es posible llevar a cabo la polimerización del monómero en presencia del inhibidor cuando los niveles de inhibidor presente son bajos y/o altos los niveles de iniciador en la polimerización. Para garantizar una buena reproducibilidad de lote en lote es recomendable remover los inhibidores de polimerización con un paso de purificación ej. destilación, tales purificaciones son a menudo fáciles de realizar<sup>34</sup>.

El oxígeno inhibe la polimerización por radicales libres, ya que la molécula de oxígeno se descompone en presencia de radicales. Para maximizar la velocidad de propagación de las cadenas poliméricas y garantizar una buena reproducibilidad en las polimerizaciones, se aconseja remover el oxígeno disuelto en el medio de reacción previo a la polimerización. La remoción del oxígeno disuelto puede realizarse por métodos de congelación/descongelación en sistemas de vacío, por ultrasonicación, o por el burbujeo de la solución monomérica con un gas inerte, ej. nitrógeno o argón.<sup>5</sup>

### **2.3- SEPARACIÓN DE CARBOHIDRATOS**

La técnica más común para la separación de carbohidratos es por cromatografía de exclusión iónica en donde la carga fija en la superficie de los poros impide a los iones cargados pasar a través de los poros. De esta manera los solutos no iónicos pueden entrar libremente, los solutos ionogénicos débiles tales como ácidos carboxílicos son parcialmente excluidos de los poros, y los fuertemente iónicos son totalmente excluidos. El orden de elución es el siguiente:

sales, seguido por ácidos o bases débiles y finalmente por las moléculas no cargadas.

Comúnmente se utilizan columnas poliméricas sulfonadas que tienen un metal de intercambio catiónico para la separación de monosacáridos; la temperatura de operación de estos sistemas están por los 85°C. Los contra-iones mas usados son  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{H}^+$ , y  $\text{Pb}^{2+}$ . Los intercambiadores catiónicos en la forma  $\text{H}^+$  son los mejores para separar mezclas de carbohidratos incluyendo azúcares ácidos y azúcares aminados<sup>37</sup>. El  $\text{Ca}^{2+}$  es usado principalmente para los azúcares del jarabe de maíz en la elaboración de los jarabes de alta fructosa a bajas temperaturas, aproximadamente 1.5 °C. El  $\text{Pb}^{2+}$  es usado para mezclas de hexosas y pentosas. El  $\text{Ag}^+$ , por otro lado, se ha utilizado para separar oligosacáridos de monosacáridos. Es importante la remoción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de las muestras cuando se usan columnas funcionalizadas con metales, ya que estos iones pueden interactuar con la columna empacada y reducir la eficiencia del proceso de separación.

Las columnas de sílica aminadas pueden ser usadas junto con una fase móvil de acetonitrilo/agua. En este proceso, interacciones polares e hidrofóbicas así como la separación entre la fase estacionaria enriquecida con agua y la fase móvil enriquecida con acetonitrilo llevan hacia fuera los compuestos deseados. La cromatografía de intercambio aniónico se realiza a pH básico usando una resina de intercambio aniónico básica como fase estacionaria, es un método reproducible y altamente utilizado. El intercambio aniónico permite separar compuestos que están cargados negativamente bajo tales condiciones básicas. La Tabla 2.4 muestra las condiciones típicas de la cromatografía de intercambio iónico para monosacáridos<sup>38</sup>.

**Tabla 2.4** Ejemplos de las condiciones típicas para la separación de monosacáridos por HPLC.

<b>Tipo de Columna</b>	<b>Fase Móvil</b>	<b>Mecanismo de Separación</b>	<b>Columnas Comerciales</b>
Intercambio Aniónico (4° amonio)	Hidroxido de Sodio	Intercambio Aniónico	Diodex Carbopac MA1
Intercambio Aniónico (Silica funcionarizada con aminopropilsilano, forma OH <sup>-</sup> )	Acetonitrilo/Agua	Enlaces de Hidrógeno entre hidroxilos y aminas	Varian MicroPak AX-5
Intercambio Catiónico (Sulfonato, forma Ca <sup>2+</sup> )	Agua	Partición iónica moderada	Waters Sugar-Pak I
Intercambio Catiónico (Sulfonato, forma Ag <sup>+</sup> )	Agua	Partición iónica moderada	Bio-Rad Aminex HPX-42 <sup>a</sup>

## **2.4- ESTAMPADO MOLECULAR DE CARBOHIDRATOS**

Los MIPs para azúcares fueron inicialmente preparados usando estampado molecular covalente mediante la formación reversible de ésteres de boro entre los grupos *cis*-diol en la molécula de azúcar y el ácido 4-vinilbencenbórico <sup>39</sup>.

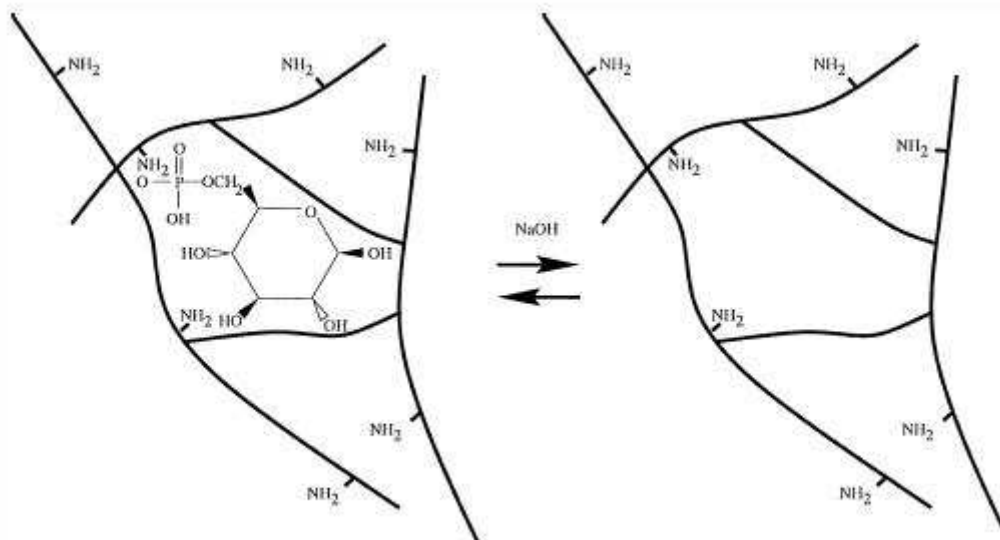
Recientemente, MIPs para azúcares derivatizados que muestran alta discriminación anomérica y epimérica fueron sintetizados por estampado no covalente usando MAA (ácido metacrílico) como monómero funcional. Los MIPs preparados con *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosa como plantilla puede separar anómeros del mismo compuesto con una resolución cercana a la línea base. En un MIP para *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosa, la glucosa (un cambio epimérico de galactosa) fue moderadamente reconocida y la manosa (dos cambios epiméricos) no fue reconocida, por lo que los sitios de reconocimiento deben involucrar interacciones por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del C-2, C-4 y el MAA, que es usado como monómero funcional <sup>40</sup>. El MIP preparado usando *p*-aminofenil- $\beta$ -galactosa paracetilado tiene alta selectividad para la  $\beta$ -galactosa sobre la

$\alpha$ -galactosa. Las interacciones iónicas entre un grupo amino del derivatizado de galactosa y un grupo carboxílico del MAA pueden jugar un papel importante en el reconocimiento de estos anómeros.<sup>41</sup>

El ácido siálico fue estampado por tres métodos diferentes: estampado covalente usando ácido 4-vinilbencenbórico, estampado no covalente usando 4-vinilpiridina (4-Vpy) o cloruro de N,N,N-trimetilaminoetil metacrilato, y un método combinado usando ácido 4-vinilbencenbórico y cloruro de N,N,N-trimetilaminoetil metacrilato. Estos últimos MIPs fueron preparados con 2-hidroxietil metacrilato (2-HEMA) y etilenglicoldimetacrilato (EDMA). La introducción del 2-HEMA (hidrofílico) en el MIP mejoró el desempeño en un buffer y en una solución de buffer metanólico (50% v/v), mientras el MIP sin 2-HEMA únicamente funcionó en el sistema buffer-metanol. Estos resultados sugieren que algunas propiedades hidrofílicas son necesarias para el reconocimiento molecular en medio acuoso, lo que habría de facilitar la penetración del ácido siálico en los sitios de reconocimiento y se espera que estos métodos puedan ser aplicados al reconocimiento molecular de azúcares oligoméricos y cadenas de azúcar glicoconjugadas.<sup>42</sup>

### 2.4.1- Estampado Molecular de Glucosa y Fructosa

La sal de Glucosa fosfato mono-sódico (GPS) fue estampada de manera no covalente<sup>12</sup> utilizando tres entrecruzantes diferentes sobre un polímero de hidrocloruro de poli(alilamina) (PAA•HCl) para formar un hidrogel (Fig. 2.5).



**Fig. 2.5** Representación esquemática del procedimiento de estampado y remoción.

Los agentes entrecruzantes en estudio fueron Epiclorohidrina (EPI), Etilglicol diglicidil éter (EGDE) y Glicerol diglicidil éter (GDE). Los resultados se muestran en las Tablas 2.5 a 2.7. La selectividad ( $\alpha$ ) se define como:  $\alpha = \text{glucosa enlazada (mg)} / \text{fructosa enlazada (mg)}$ . Las pruebas para medir la capacidad de enlace de estos polímeros fueron realizadas en agua desionizada.



**Tabla 2.5** Capacidad de enlace del hidrogel entrecruzado con EGDE en mg de azúcar / g de polímero seco.

<b>Polímero</b>	<b>100% Glucosa</b>	<b>100% Fructosa</b>	<b><math>\alpha</math></b>
<b>MIP</b>	560	230	2.43
<b>Control</b>	180	110	1.64
<b><math>\alpha</math></b>	3.11	2.09	

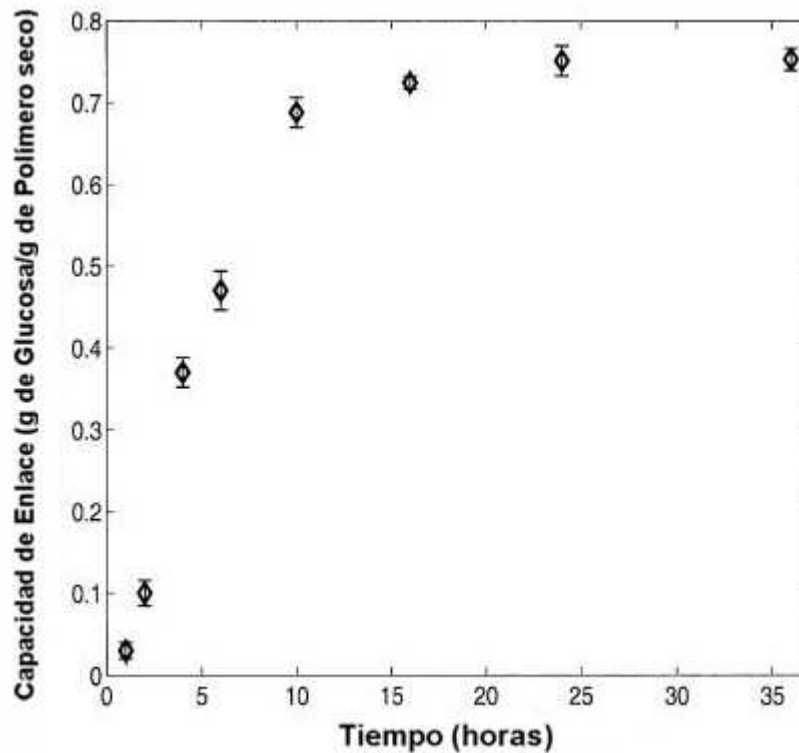
**Tabla 2.6** Capacidad de enlace del hidrogel entrecruzado con EPI en mg de azúcar / g de polímero seco.

<b>Polímero</b>	<b>100% Glucosa</b>	<b>100% Fructosa</b>	<b><math>\alpha</math></b>
<b>MIP</b>	580	0	
<b>Control</b>	200	0	
<b><math>\alpha</math></b>	2.9		

**Tabla 2.7** Capacidad de enlace del hidrogel entrecruzado con GDE en mg de azúcar / g de polímero seco.

<b>Polímero</b>	<b>100% Glucosa</b>	<b>100% Fructosa</b>	<b><math>\alpha</math></b>
<b>MIP</b>	390	220	1.77
<b>Control</b>	130	50	2.6
<b><math>\alpha</math></b>	3	4.4	

El hidrogel entrecruzado con EDGE alcanzo el equilibrio de enlace a las 36 h (Fig. 2.6).



**Fig. 2.6** Cinética de enlace del hidrogel estampado con GPS y entrecruzado con EDGE, alcanzando el equilibrio a las 36 h

También otra sal, la Glucosa 6 fosfato mono-bárico (GPS-Ba) fue estampada por la vía no covalente, utilizando hidrocloreuro de poli(alilamina) (PAA•HCl) y entrecruzado con EPI, los resultados se muestran en la Tabla 2.8.

**Tabla 2.8** Selectividad de enlace del hidrogel entrecruzado con EPI en mg de azúcar / g de polímero seco.

Polímero	100% Glucosa	100% Fructosa	$\alpha$
MIP	593	110	5.39
Control	139	105	1.32
$\alpha$			
50-50% glucosa-fructosa			
Polímero	Glucosa	Fructosa	$\alpha$
MIP	601	84	7.15
Control	132	79	1.67
$\alpha$	4.55	1.06	

Es importante hacer notar que estos polímeros, a pesar de su gran capacidad de enlace y selectividad tienen una pobre integridad mecánica, especialmente los entrecruzados con GDE. Aproximadamente el 25% de cada polímero es perdido debido a la excesiva fractura, dando al hidrogel una consistencia pastosa, lo cual los hace inadecuados para ser utilizados como fases estacionarias en columnas cromatográficas .

Se estampó D-glucosa<sup>27</sup> mediante interacciones no covalentes utilizando diferentes monómeros; ácido metacrílico (MAA), ácido acrílico (AA), acrilamida (Aam) y 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), con diferentes entrecruzantes: poli(etilen glicol) 200 metacrilato (PEG200MA), poli(etilen glicol) 200 dimetacrilato (PEG200DMA), poli (etilen glicol) 600 dimetacrilato para obtener hidrogeles. La capacidad de enlace de los hidrogeles de acrilamida-PEG200DMA en agua se muestran en la Tabla 2.9.

**Tabla 2.9** Capacidad de enlace del hidrogel de Acrilamida-PEG200DMA en mg de azúcar / g de polímero seco.

<b>Polímero</b>	<b>100% Glucosa</b>
<b>MIP</b>	1.53
<b>Control</b>	0.45
<b><math>\alpha</math></b>	3.4

Las condiciones de equilibrio fueron alcanzadas a las 48 h (Fig. 2.7).

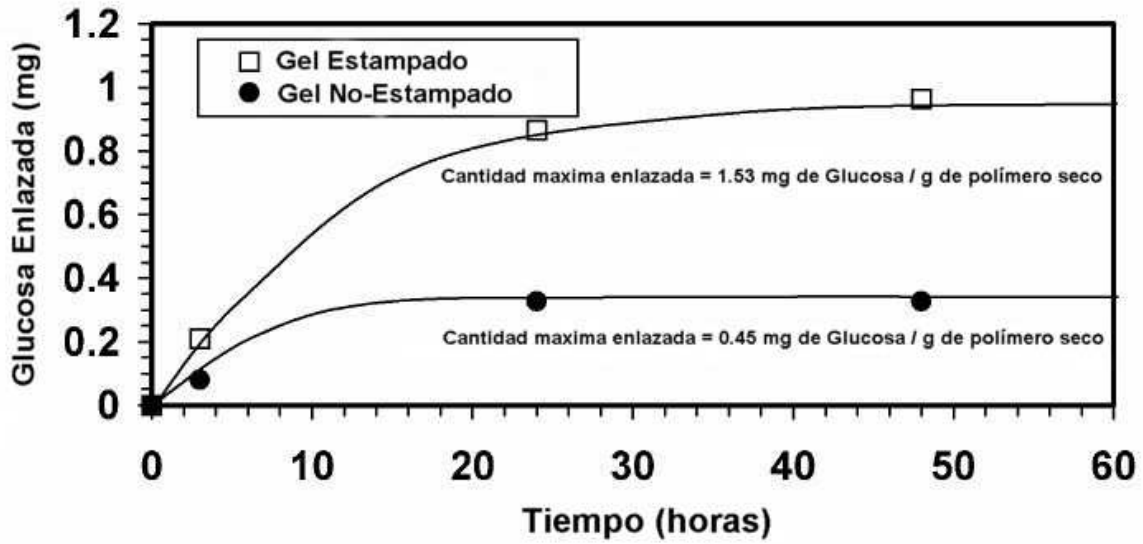


Fig. 2.7 Cinética de enlace de la D-glucosa estudiado en agua, copolímero de Acrilamida-PEG200DMA.

La D-fructosa fue estampada por una combinación de métodos covalente y no covalente<sup>43</sup> usando 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) funcionalizado con ácido bórico, ácido metacrílico y etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como entrecruzante para el desarrollo de un sensor fluorescente (Fig. 2.8).

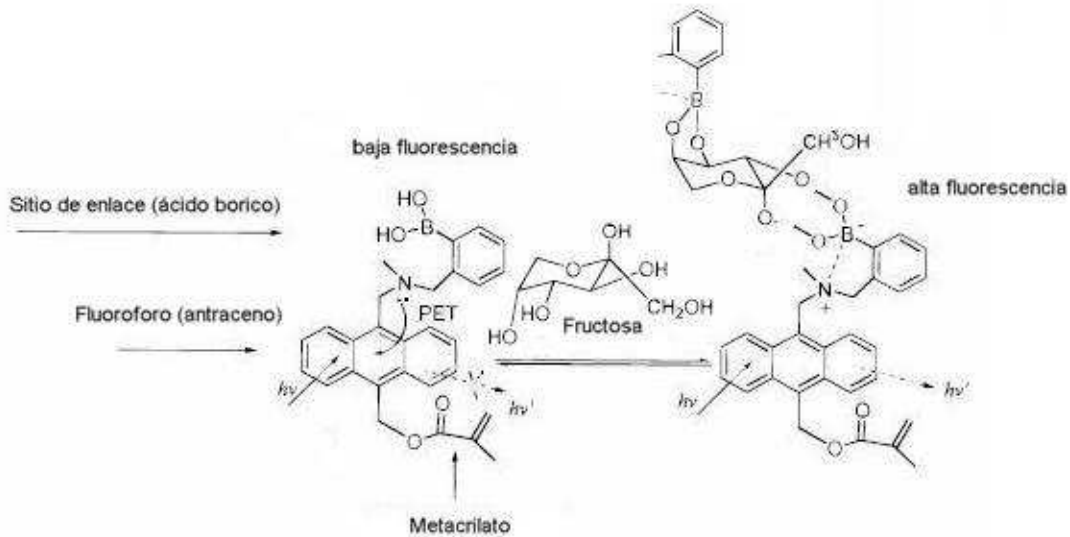
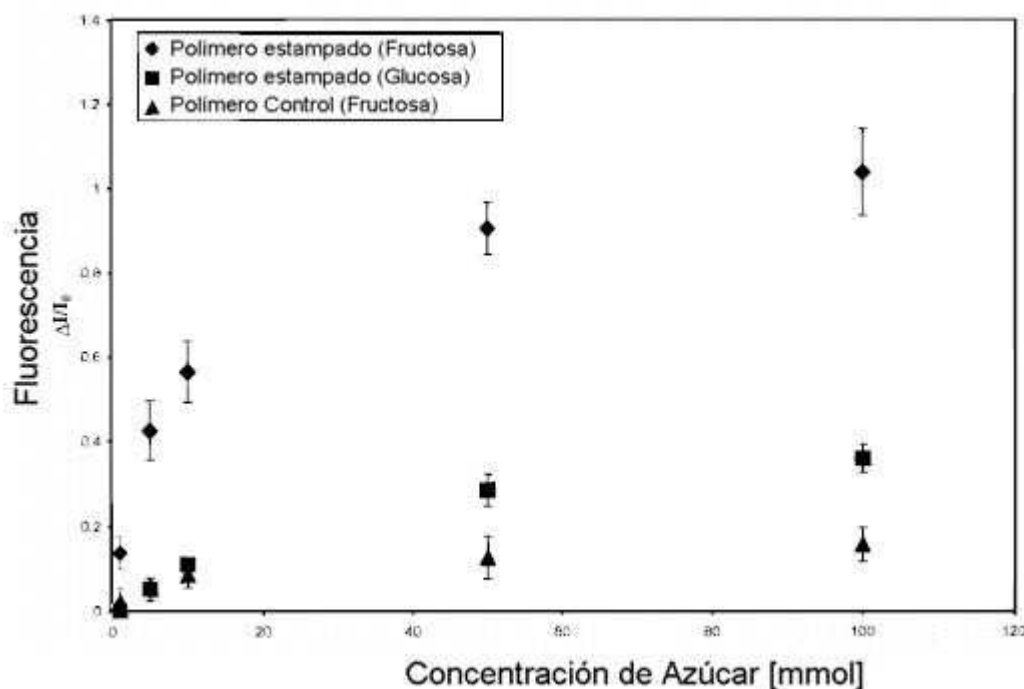


Fig. 2.8 Enlace covalente de la fructosa con el ácido bórico contenido en el monómero.

El monolito polimérico obtenido fue molido, lavado y secado antes de ser usado para la evaluación de su capacidad de enlace y selectividad mediante estudios de fluorescencia, las partículas poliméricas fueron suspendidas en soluciones de MeOH / H<sub>2</sub>O 50% (v/v) y 0.05 M de fosfato como buffer a pH 7 con 100% de fructosa y 100% de glucosa a diferentes concentraciones. El espectro de emisión se muestra abajo (Fig. 2.9).

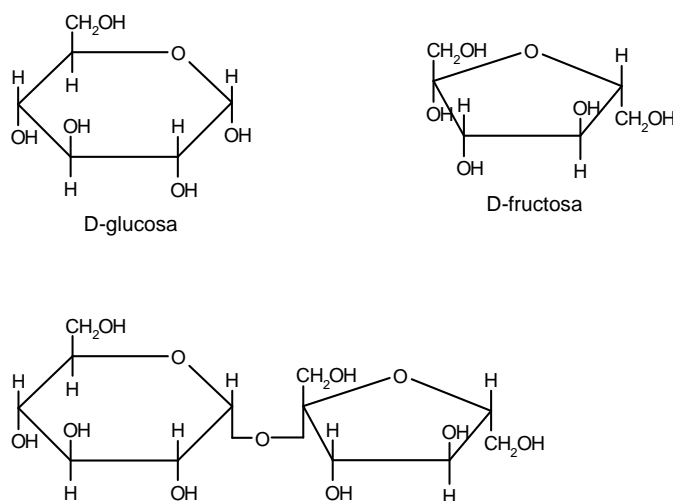


**Fig. 2.9** Cambio en la intensidad de fluorescencia del polímero estampado con D-fructosa vs concentración de azúcar ( $\lambda_{\text{exc}}$  370 nm;  $\lambda_{\text{emr}}$  426 nm).

### 2.4.1.1-Estructura y Propiedades

**Glucosa (Dextrosa).** (Figura 2.10)<sup>62</sup> La fórmula condensada de la glucosa es C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, el peso molecular es 180.2 g/mol, los cristales anhidros funden a 146°C. El monohidrato de glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>•H<sub>2</sub>O) funde a 83°C. La glucosa es menos soluble en agua que la sacarosa. Es soluble en etanol e insoluble en éter. En solución, la glucosa se presenta en tres formas. La forma de cadena tiene un grupo aldehído y puede reducir una solución alcalina de sales cúpricas, dando

positiva la prueba para los azúcares reductores. En la forma de anillo existe en configuraciones  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales se encuentran en equilibrio en disolución. Las soluciones de glucosa muestran mutarrotación. La determinación de glucosa se efectúa mediante diversos métodos basados en las reacciones reductoras de su grupo aldehído. Si se desean realizar determinaciones más específicas de glucosa en mezcla con otros azúcares se utilizan técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia o métodos enzimáticos.

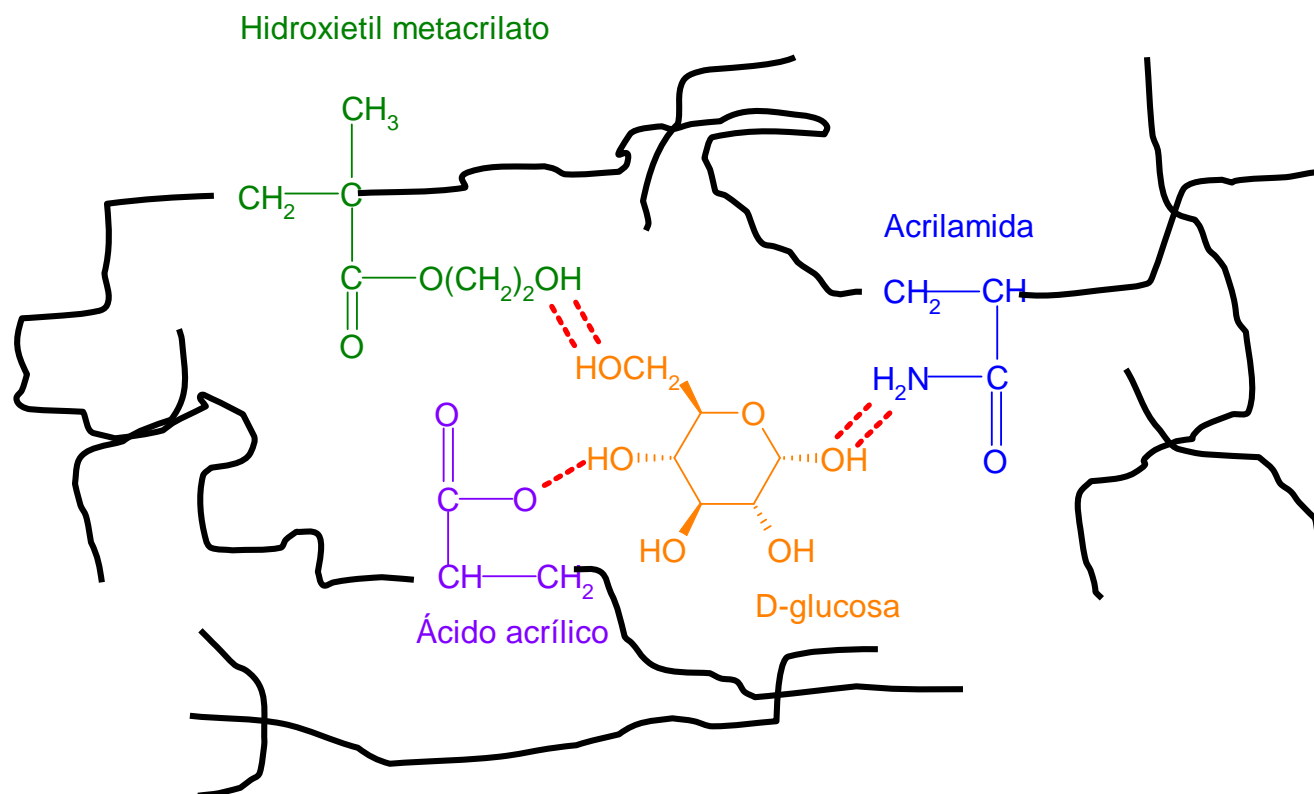


**Figura 2.10** Representación espacial de las formas de la glucosa y fructosa, y de la condensación de ambas para formar sacarosa.

**Fructosa (Levulosa) (Figura 2.10)**<sup>62</sup>. Llamada también azúcar de las frutas. La fructosa es más dulce que la sacarosa y la glucosa. La fórmula condensada de la fructosa es la misma que el de la glucosa, ( $C_6H_{12}O_6$ ) y el peso molecular es de 180.2 g/mol. Los cristales funden a  $105^\circ C$ , la fructosa es muy soluble en agua y ligeramente soluble en etanol. Al igual que la glucosa, la fructosa es un azúcar reductor, pero posee un grupo cetona en lugar de un grupo aldehído. Además, al igual que la glucosa, la fructosa posee formas  $\alpha$  y  $\beta$  y también se encuentra en forma de anillos tanto de cinco como de seis miembros (furanosa y piranosica). En forma sólida existe principalmente como piranosica, pero en solución se establece el equilibrio entre los cuatro tipos. Los métodos de detección para la fructosa en mezclas son similares a los de la glucosa.

### 2.4.1.2- Síntesis

Los residuos aminoácidos que enlazan glucosa en la naturaleza son: Aspartato, Glutamato, Aspargina y Serina, y los monómeros sintéticos que imitan las interacciones de enlace de estos aminoácidos se indican en la **Figura 2.11**.<sup>44</sup>



**Fig 2.11** Monómeros utilizados para el estampado molecular de glucosa

El ácido metacrílico ha sido ampliamente usado como un monómero funcional universal debido a su bajo costo y a las características de sus puentes de hidrógeno donadoras y aceptoras, así como su afinidad a interacciones iónicas.<sup>7</sup>

Un grupo carboxilo tiene la habilidad de formar enlaces de hidrógeno estables en un solvente polar, ej. ácido metacrílico (MAA). La acetamida tiene una constante dieléctrica de 67.6, y en el ácido acético ésta tiene un valor de 6.20. El momento dipolo de la acetamida es de 3.76 D, mientras para el ácido acético este valor es de 1.70 D. La gran diferencia en la constante dieléctrica y el momento

dipolo entre la acetamida y el ácido acético sugieren que un grupo amida también puede formar fuertes enlaces de hidrógeno al igual que el grupo carboxílico en disolventes polares.<sup>14</sup> Las amidas son capaces de crear interacciones iónicas con especies aniónicas así como enlaces de hidrógeno.<sup>12</sup>

Tomando en cuenta toda la información expuesta anteriormente, para el estampado molecular de glucosa se utilizó acrilamida como monómero funcional y etilenglicol dimetacrilato como entrecruzante, por lo que se buscaron las reactividades relativas de estos monómeros; en el caso del etilenglicol dimetacrilato se utilizaron los valores del metil metacrilato como se mencionó en un apartado anterior.

**Tabla 2.10** Reactividades relativas de los monómeros a emplear<sup>63</sup>

<b>Monómero 1</b>	<b>Monómero 2</b>	<b><math>r_1</math></b>	<b><math>r_2</math></b>
Acrilamida	Metil metacrilato	0.9	3.0

Por otro lado se realizó una simulación utilizando un software desarrollado por el Instituto Tecnológico de Virginia y accesible vía Internet en la página web de dicha institución ([www.chem.vt.edu](http://www.chem.vt.edu)). Los datos alimentados al software fueron las reactividades relativas y las moles de cada monómero. Como se mencionó en apartados anteriores altas relaciones de entrecruzante son requeridas para el estampado molecular y en este caso para la formación de microesferas > 20% , por lo que se decidió utilizar una relación molar de monómero funcional / entrecruzante de 3:1 que equivale a una relación de entrecruzante del 25%, los cuadros de color negro representan al etilenglicol dimetacrilato, y los de color claro representan a la acrilamida (Fig. 2.12), se puede ver que si es posible una copolimerización por parte de estos monómeros. Cabe aclarar que el software no distingue si los monómeros son monofuncionales o multifuncionales, por lo que el copolímero representado es la reacción entre dos monómeros monofuncionales. Esta aproximación teórica validó nuestro sistema en la etapa inicial del estudio, ya



que nos indica, que es factible la copolimerización de la acrílamida con el etilenglicol dimetacrilato de manera homogénea.

The screenshot displays a web browser window titled "1.2.3 Build a Random Copolymer - Microsoft Internet Explorer". The address bar shows the URL: [http://www.chem.vt.edu/chem-dept/acs/copoly/copoly1\\_2\\_3.html](http://www.chem.vt.edu/chem-dept/acs/copoly/copoly1_2_3.html). The main content area is titled "1.2.3 Build a Random Copolymer" and features a simulation interface. On the left, there are input fields for reactivity ratios  $r_A$  (0.9),  $r_B$  (3), and monomer concentrations  $[MA]$  (3.0),  $[MB]$  (1.0). A "Start" button is present. In the center, a pie chart indicates the composition: A: 75.0% (purple) and B: 25.0% (orange). Below the pie chart, a progress bar shows "Progress: 100%". On the right, a text box titled "1.2.3" provides instructions and a list of "Some things to investigate:"

**1.2.3**  
You now have an opportunity to build a random copolymer for yourself. Run several different reactions where the values of  $r_A$  and  $r_B$  are nearly equal. During the course of each reaction, be sure to press the 'Pause' button several times in order to **carefully note the statistics** about the polymer.

**Some things to investigate:**

- Why is the *instantaneous* percent composition A : B always near 50% : %50?
- Why do all triads occur with nearly equal frequency at any point during the reaction?
- What effect does concentration have on polymer structure? Can it affect the randomness of monomer distribution?
- How far can  $r_A$  and  $r_B$  deviate from 1 before the system...

At the bottom of the interface, a list of occurrence statistics is shown:

Stats: 100% completion

- Occurrences BA: 26
- Occurrences AAA: 29
- Occurrences AAB: 21
- Occurrences ABA: 25
- Occurrences BBB: 0
- Occurrences BBA: 0
- Occurrences BAB: 4

A detailed view of the polymer chain is shown below the statistics:

Chain length: 102 A units: 76 B units: 26

```

B-A-A-B-A-B-A-A-A-A-A-A-A-A-B-A-A
B-A-A-A-A-B-A-A-B-A-A-A-A-B-A
A-A-A-B-A-A-A-A-A-A-B-A-A-B-A-A
A-B-A-B-A-A-B-A-A-A-A-B-A-A-B
A-B-A-A-B-A-A-B-A-A-A-A-B-A-A
  
```

**Fig. 2.12** Software utilizado en la simulación de la copolimerización entre la acrílamida y el etilenglicol dimetacrilato.

### 2.4.1.3- Procedimiento General para la síntesis de MIPs.

La molécula a estampar y el monómero funcional son disueltos en el disolvente. A la solución son adicionados el entrecruzante junto con el iniciador (generalmente 2% en peso del monómero total). Para un entrecruzante difuncional la relación molar entre monómero funcional y entrecruzante es comúnmente de 1:2 a 1:6. Para un entrecruzante trifuncional la relación es comúnmente de 5:2 a 1:1.<sup>30</sup> La mezcla de reacción es saturada con nitrógeno, la polimerización puede ser iniciada por UV o térmicamente.<sup>31</sup> Las micro-esferas

obtenidas son colectadas por centrifugación, y las moléculas estampadas son removidas por extracción con disolvente.

### **2.5- CARACTERIZACIÓN**

Los polímeros entrecruzados son difíciles de caracterizar a causa de su insolubilidad. A los polímeros estampados molecularmente, generalmente se les realizan tres tipos de caracterización; caracterización química, caracterización morfológica, y caracterización del comportamiento de reconocimiento molecular.<sup>5</sup>

#### **2.5.1 Caracterización Química**

Dada su insolubilidad, debido al elevado grado de entrecruzamiento, los polímeros estampados molecularmente generalmente no se pueden caracterizar con métodos que involucran al material en solución. Existen métodos analíticos que pueden ser usados en muestras sólidas y que se incluyen a continuación:

*Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)*<sup>45, 46</sup>

El espectro FTIR para polímeros estampados puede ser realizado fácilmente (e.j. en forma de pastilla o película) y de modo similar al microanálisis elemental se extrae información cualitativa de la composición del polímero. El método es particularmente valioso cuando hay diferencia de ambientes químicos en la muestra (e.j. el monómero funcional y el entrecruzante en un polímero estampado). La interpretación es a veces ambigua debido a que las bandas de absorción quedan muy juntas y a menudo se sobreponen. Es también posible el uso de FTIR para examinar interacciones no covalentes, ej. enlaces de hidrógeno, aunque la sensibilidad de la técnica limita su utilidad a este respecto.

### *Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)* <sup>47</sup>

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica que mide el cambio de entalpía de un polímero en función de la temperatura. Las aplicaciones típicas incluyen la determinación del % de cristalinidad, grado de mezclas de polímeros y copolímeros, y mediciones de temperaturas de transición, tales como el punto de fusión  $T_m$  y la temperatura de transición vítrea  $T_g$ , en el caso de los polímeros entrecruzados estos no presentan  $T_g$  o es casi imperceptible y no presentan  $T_m$ .

### **2.5.2 Caracterización Morfológica**

Es posible analizar la morfología de los polímeros estampados para conocer la estructura. Dependiendo del método de análisis se puede obtener información útil sobre el tamaño de los poros, su volumen, y del grado de entrecruzamiento, así como la distribución y el área superficial específica de los materiales.

### *Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)* <sup>5</sup>

La microscopía puede ser usada en una variedad de formas para analizar polímeros estampados a una variedad de escalas. Por ejemplo la microscopía de luz puede ser usada para verificar la integridad estructural de las partículas poliméricas mientras que la microscopía electrónica (SEM) puede ser usada para ver macroporos de tamaño micrométrico y la microscopía de transmisión (TEM) para ver estructuras de tamaño nanométrico.

### *Porosimetría por Sorción de Nitrógeno<sup>5</sup>*

La porosimetría por sorción de nitrógeno involucra una masa fija de polímero seco expuesta a un gas (generalmente nitrógeno) en una serie de presiones fijas. A través de la medición de la cantidad de gas sorbida como una función de la presión, pueden ser construidas isothermas de sorción. Aplicando la teoría de (BET) y modelos matemáticos se puede obtener información sobre el área superficial específica ( $\text{m}^2/\text{g}$ ), volumen de poro específico ( $\text{ml}/\text{g}$ ), diámetro promedio de poro y distribución de tamaño de poro. El método es particularmente útil para analizar en detalle poros de tamaño medio (meso-) y pequeños (micro-). La IUPAC define el tamaño de poro como sigue: microporos  $< 2\text{nm}$ ;  $2\text{nm} <$  mesoporos  $< 50\text{nm}$ ; macroporos  $> 50\text{nm}$ .

### *Grado de Entrecruzamiento<sup>47</sup>*

Los polímeros presentan cierto hinchamiento cuando se disuelven en ciertos solventes. Esta disolución sucede cuando el poder de solvatación del disolvente se impone sobre las fuerzas de cohesión que existen entre las moléculas poliméricas. Esta cohesión, sin embargo, aumenta al aumentar el grado de entrecruzamiento. Por lo tanto, un polímero entrecruzado presenta menos hinchamiento y por lo general suelen ser insolubles en disolventes orgánicos. La cantidad nominal de hinchamiento dependerá principalmente de la estructura química del polímero y del tipo de disolvente utilizado. Para evaluar el hinchamiento se utiliza en este caso la siguiente ecuación derivada por Flory y Rehner,<sup>47</sup> (Ecuación 1).

$$-\left[\ln(1 - V_r) + V_r + \chi V_r^2\right] = \rho V_0 V_r^{1/3} / \overline{M_c} \quad (1)$$

donde  $V_r$  es la fracción volumen del polímero entrecruzado, en la muestra de polímero (entrecruzado) hinchado con disolvente,  $\chi$  es el parámetro de interacción

Flory-Huggins entre el polímero entrecruzado y el disolvente,  $\rho$  es la densidad del polímero entrecruzado sin aditivos ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ),  $V_0$  es el volumen molar del solvente ( $\text{cm}^3/\text{g mol}$ ),  $M_c$  es el peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento ( $\text{g}/\text{g mol}$ ). La relación entre el hinchamiento volumétrico y el grado de vulcanización está dada por la ecuación 2, esta relación indica que  $V_r$  aumenta cada vez menos al aumentar el grado de vulcanización.

$$-\frac{[\ln(1-V_r) + V_r + \chi V_r^2]}{(V_r)^{1/3}} = \frac{\rho V_0}{M_c} \quad (2)$$

### **2.5.3 Caracterización del Comportamiento de Reconocimiento Molecular.**

Es indispensable conocer y cuantificar las características de enlace de nuestro polímero para saber cuanto analito es capaz de atrapar, que tan selectivo es nuestro polímero frente a una mezcla de moléculas parecidas a la molécula objetivo, y medir su cinética de enlace para ver en cuanto tiempo llega al equilibrio. Esto se hace experimentalmente colocando al MIP en una solución que contiene a la molécula de interés y cuantificando la cantidad absorbida mediante la técnica analítica adecuada para esa molécula.<sup>48</sup>

### **2.5.4 Propiedades de los Polímeros Estampados Molecularmente.**

Estudios reportados basados en copolímeros de ácido metacrílico-co-etilenglicol dimetacrílate estampados molecularmente con teofilina han mostrado que estos son capaces de resistir temperaturas de alrededor de  $150\text{ }^\circ\text{C}$  sin la pérdida de su afinidad por la plantilla<sup>49</sup>. Exposiciones a temperaturas por arriba de este punto resulta en una reducción de la afinidad por la plantilla. Además, los

polímeros demostraron ser capaces de resistir ácidos, bases, solventes orgánicos y elevadas temperaturas sin una aparente pérdida de afinidad por la plantilla. Estos resultados muestran la estabilidad química y física de los copolímeros y de su potencial para usarse como substitutos de elementos de reconocimiento biológico, por ejemplo, en sensores.<sup>50</sup>

### **2.5.5 Aplicaciones Potenciales**

La tecnología MIP esta ahora en el proceso de maduración después de un lento comienzo debido a problemas asociados con pobres desempeños en ambientes acuosos y a la ausencia de algún procedimiento general para el diseño de MIPs. Como un pequeño resultado de la información disponible sobre las aplicaciones comerciales de los MIPs, las tres principales áreas de aplicación de los MIP's son:<sup>50</sup>

- Matrices cromatográficas para separaciones (ej. enantiomeros).
- Polímeros con actividad catalítica o imitación de enzimas.
- Dispositivos para biosensores.

#### *Separaciones*

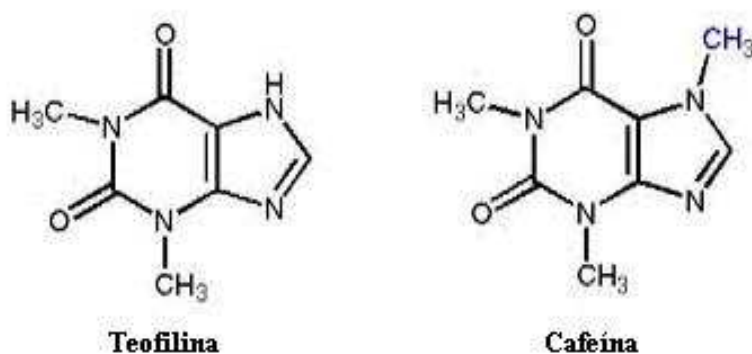
Pueden utilizarse para preparar columnas cromatográficas, membranas y extracciones en fase sólida para separaciones quirales y de afinidad en la industria química, farmacéutica y biotecnológica<sup>51</sup>.

Los MIPs pueden operar en condiciones extremas, particularmente en solventes orgánicos, esto es atractivo para la industria química porque pueden pasar de procesos con multi-pasos de enriquecimiento o purificación a un paso de separación<sup>49, 60</sup>.

Existen alrededor de 500 drogas en el mercado que son ópticamente activos, cerca del 90% de estos son administrados como mezclas racémicas. La

FDA requiere ahora que para las drogas ópticamente activas ambos enantiómeros deben ser analizados de manera separada para perfiles farmacocinéticos y toxicológicos, por lo que existe una gran necesidad en desarrollar métodos para la separación de enantiómeros<sup>8</sup>.

Se han desarrollado MIP's para alcaloides u opiato que pueden discriminar entre el compuesto estampado y un compuesto estrechamente similar(Fig. 2.13)<sup>52</sup>.



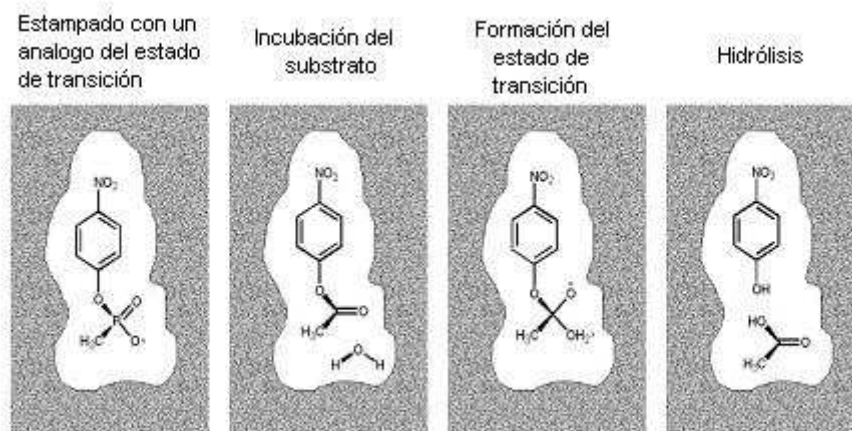
**Fig. 2.13** Discriminación entre moléculas estructuralmente similares

### *Polímeros estampados como imitadores de enzimas*

La función catalítica de los MIPs es bien conocida y como ejemplos existen moléculas directamente sintetizadas por hidrolasa y estereosas artificiales (Fig. 2.14). Sin embargo, la velocidad catalítica alcanzada hasta ahora por los MIPs es relativamente modesta, esto probablemente se debe a que la colocación estereoquímica específica de los grupos catalíticos no es la adecuada<sup>53</sup>. El área más promisoría de aplicación es en el diseño de zeolitas (cedazos moleculares) para gases, aceites refinados y procesamiento. Otras dos áreas prometedoras son la estereocatálisis y modificación de enzimas. De los 1200 compuestos farmacéuticos, varias en desarrollo clínico, 68% son quirales y deben idealmente ser sintetizados como un solo producto enantiomérico. Un nicho potencialmente interesante para la tecnología MIP es su aplicación en la regulación de la actividad

enzimática, aunque este método todavía necesita refinarse antes de poder ser adaptado a la tecnología de procesos<sup>54</sup>.

Se ha observado que si los estampados son preparados con análogos del estados de transición, el MIP producido estabiliza mejor el estado de transición, dando como resultado una mejora en la velocidad de producción.<sup>55</sup>



**Fig. 2.14.** Diseño de una hidrolasa artificial mediante estampado molecular.

De esta manera, los MIP's son un armazón dentro del cuál se sitúan grupos catalíticos.

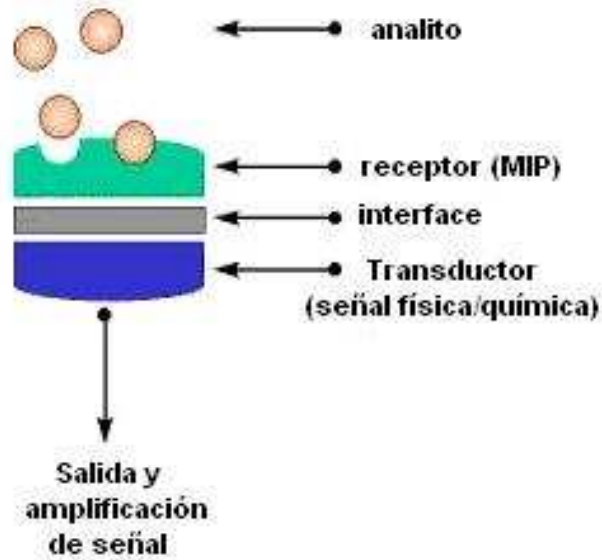
### *Polímeros estampados como sensores para sustratos específicos.*

Los MIPs pueden ser excelentes alternativas como receptores biológicos en biosensores principalmente porque estos tiene gran estabilidad. Los MIPs pueden ser sintetizados para compuestos donde los receptores o enzimas no estén disponibles o cuando estos sean demasiado caros<sup>56</sup>. El proceso de polimerización es totalmente compatible con la microfabricación usada en la tecnología de sensores.



Como en el caso de las separaciones, el área de aplicación mas promisoría para los sensores MIP es en la medicina y la industria farmacéutica<sup>57</sup>.

- “Los Biosensores” son dispositivos que integran receptores de moléculas específicas con dispositivos de transducción de señales (Fig. 2.15).



**Fig. 2.15** Diseño de un biosensor donde el receptor es un polímero estampado molecularmente

- El transductor puede convertir la energía de enlace del MIP/molécula objetivo en un intercambio de protones, absorbanza de luz, calor, etc. Esta señal fisicoquímica es amplificada y mandada a un dispositivo de medición.
- En principio, la molécula objetivo puede ser un compuesto que ha sido estampado específicamente por ejemplo, una toxina<sup>58</sup>.

### *Materiales con Funciones Especiales*

La aplicación de la tecnología MIP en esta área es nueva pero tiene un potencial considerable para: (1) matrices de liberación de drogas; y (2) el uso de MIPs para alterar la biocompatibilidad superficial de dispositivos médicos. Aunque los MIPs han demostrado ser materiales promisorios en algunas de estas aplicaciones, la limitada información biomédica evita la evaluación de este potencial comercial en el presente<sup>59</sup>.

## CAPÍTULO III DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 3.1 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO



Figura 3.1 Equipo utilizado para realizar el estampado molecular de glucosa

Para efectuar la síntesis del polímero se utilizaron dos reactores enchaquetados de 50 ml, uno para la síntesis del polímero estampado y otro para la síntesis del polímero control (sin estampar), los cuales tienen una tapa con septum para la inyección de los reactivos y desoxigenación con nitrógeno, así como para mantener la hermeticidad de los reactores; estos reactores fueron conectados en serie a un recirculador con calefacción para garantizar las mismas condiciones de reacción en los dos reactores.

### 3.2 MATERIAL

$\beta$ -D(+)-Glucosa (**plantilla molecular**) (Sigma-Aldrich, Grado analítico),  
D(-) Fructosa (**análogo de la plantilla molecular**) (Merk, Grado analítico),  
Acrilamida (AAM) (**monómero funcional**) (J.T.Baker, Ultrapuro, Bioreactivo),  
Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) (**agente entrecruzante**) (Sigma-Aldrich,  
Grado reactivo), Azobisisobutironitrilo (AIBN) (**iniciador de radicales libres**)

(Aldrich), Acetonitrilo (MeCN) (**porogeno y disolvente**) (Mallinckrodt, Grado analítico), Agua desionizada (**disolvente**).

### 3.3 MEDICIONES



**Figura 3.2** Equipo utilizado para determinar la concentración de glucosa y fructosa

La concentración de glucosa y fructosa fue determinada por HPLC (Hewlett Packart Series 1050 Liquid Chromatography) acoplado a un detector de dispersión de luz (Polymer Laboratories-ELS 1000) usando una columna cromatográfica Hypersil-NH2 (Meta Chem) y utilizando como fase móvil acetonitrilo/agua (85:15, v/v) a un flujo de 1 ml/min.

### 3.4 TÉCNICA EXPERIMENTAL

El método empleado para la síntesis está basado en reportes previos<sup>27</sup> mediante polimerización por precipitación. Las cantidades de cada uno de los reactivos, iniciador y disolventes empleados se describen en la Tabla 3.1.

### Estampado de Micro esferas Poliméricas

**Tabla 3.1** Preparación de las microesferas estampadas molecularmente

<b>Polímero</b>	<b>Plantilla</b>	<b>P:MF AAM</b>	<b>E:MF EGDMA</b>	<b>Iniciador AIBN 6 % peso</b>	<b>Disolventes ml</b>
<b>MIP 1</b>	( 0.207 g )	1:3 ( 0.245 g )	1:3 ( 0.227 g )	( 0.0302 g )	MeCN/H <sub>2</sub> O 17/3
<b>MIP 2</b>	( 0.207 g )	1:3 ( 0.245 g )	1:4 ( 0.170 g )	( 0.0282 g )	MeCN/H <sub>2</sub> O 17/3

<sup>a</sup> Temp. 60°C, Tiempo de reacción: 4 h; P = Plantilla, MF = Monómero Funcional, E = Entrecruzante

Las esferas estampadas molecularmente se prepararon mediante polimerización en solución por radicales libres bajo altas condiciones de dilución (Tabla 3.1). En el caso de la molécula de glucosa existen 5 posibles sitios de interacción, sin embargo en un apartado anterior (estampado molecular de carbohidratos), en el MIP estampado con *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosa se ha visto que los sitios de reconocimiento involucran interacciones por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del C-2, C-4, y el monómero funcional, lo cual nos dice que no todos los sitios de interacción de este carbohidrato interviene en la formación del complejo monómero funcional-plantilla. Tomando en cuenta esta y otras consideraciones derivadas de apartados anteriores, para el caso de la glucosa se decidió usar una relación molar de monómero funcional / plantilla de 3:1, esto con el fin de tener un exceso de monómero tal, que desplace el equilibrio hacia la formación del complejo monómero funcional-plantilla, y minimizando en la medida de lo posible la formación de sitios de enlace no específicos, de igual manera tomando en cuenta los datos arrojados por la simulación se decidió ocupar una relación molar de entrecruzante / monómero funcional de 1:3 (25 % de entrecruzante) y 1:4 (20% de entrecruzante). En el procedimiento general la plantilla fue disuelta en 20 ml de una mezcla de acetonitrilo (MeCN) con 15 % en volumen de agua D.I. en un reactor enchaquetado de 50 ml conectado a un baño

### Capítulo III: Desarrollo Experimental

de temperatura controlada con recirculación. Se adicionó la acrilamida (AAM) al reactor dejándolo reposar por 5 min. para permitir que se formara el complejo monómero funcional-plantilla mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos  $-OH$  de la glucosa y los grupos  $-NH_2$  de la acrilamida previo a la polimerización, mientras la solución era burbujeada con nitrógeno para remover el oxígeno presente en el medio y así favorecer la polimerización. El etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) y el iniciador de radicales libres azobisisobutironitrilo (AIBN) fueron adicionados. La solución se dejó burbujeando por 15 min más manteniendo al reactor bajo una atmósfera inerte de nitrógeno a  $60^{\circ}C$  por 4 h. Las microesferas fueron recuperadas por centrifugación ( $1625\text{ g} \times 10\text{ min.}$ ).



**Figura 3.3** Extracción de la plantilla mediante el método soxhlet

La plantilla fue removida en un extractor Soxhlet por 24 h utilizando agua como solvente (Fig. 3.3). Los materiales fueron secados por liofilización. Microesferas no estampadas (polímeros control) fueron preparadas de la misma forma pero sin la adición de la molécula plantilla (glucosa). La concentración de glucosa fue determinada por HPLC. Los polímeros no estampados (NIPs) o polímeros control fueron preparados y tratados de la misma forma, siendo la única diferencia la ausencia de glucosa.

### 3.5 CARATERIZACIÓN

La caracterización de los polímeros consistió de: Espectroscopía Infrarroja (IR), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Microscopía de Transmisión (TEM), Porosimetría por Sorción de Nitrógeno, % en Gel, Grado de Entrecruzamiento, Capacidad de Enlace, Selectividad y Cinética de Enlace.

#### 3.5.1 PROPIEDADES QUÍMICAS

##### 3.5.1.1 Espectroscopía Infrarrojo

El análisis de la estructura por infrarrojo fue realizada en el laboratorio de la USAI, Facultad de Química, UNAM. Se usó un Espectrómetro de Infrarrojo de Transformada de Fourier con un intervalo de longitudes de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  FTIR, Perkin Elmer 1605. El análisis se llevó a cabo en estado sólido. Esto con el fin de determinar que tipo de enlaces (grupos funcionales) están presentes en los polímero sintetizados, es también posible examinar interacciones no covalentes ej. puentes de hidrógeno (entre el polímero y la glucosa), aunque la sensibilidad de la técnica limita su utilidad a este respecto.

##### 3.5.1.2 Análisis Térmico DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido)

La temperatura de transición vítrea se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido en un analizador térmico Du Pont Instruments, 910 Differential Scanning Calorimeter del Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM el cual aplica un flujo de calor a la muestra, el equipo detecta la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la temperatura de fusión ( $T_f$ ) y el  $\Delta H$  de fusión, debido a que nuestro material debe ser un copolímero altamente

entrecruzado se espera que este no presente  $T_g$  o sea casi imperceptible y que no presente  $T_f$  ni  $\Delta H$  de fusión.

Las pruebas realizadas por este equipo se realizaron en un intervalo de temperaturas de 0°C a 250°C. La temperatura de transición vítrea  $T_g$  reportada en la literatura para la poli(acrilamida) es de 188°C, pero no se encontró reportado para el poli(etilenglicoldimetacrilato) debido a que los polímeros altamente entrecruzados no tienen  $T_g$  o es casi imperceptible por lo que debemos esperar que para la poli(acrilamida-co-etilenglicoldimetacrilato) este sea el caso.

### **3.5.2 MORFOLOGÍA**

#### **3.5.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

El análisis morfológico por SEM fue realizado en el departamento de Microscopia de la USAI, Facultad de Química, UNAM. Se usó un Microscopio electrónico JEOL JSM-5900 V Scanning Electrón Microscope. Las muestras fueron colocadas en una película de grafito adhesivo las cuales fueron cubiertas con una capa de oro y montadas en una rejilla de observación, las condiciones de operación fueron a alto vacío con una energía de radiación de 20kV y observadas a X10 000 y X20 000 aumentos.

#### **3.5.2.2 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)**

El análisis por TEM fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Se usó un microscopio JEOL JEM-1200 EX II Electrón Microscope para analizar la muestra a nivel nanométrico. Las muestras fueron colocadas previamente en tubos bin los cuales contenía una resina epóxica y se centrifugaron por 20 min., después la resina fue polimerizada a 60°C por 24 h. La polimerización tuvo lugar en el tubo



bin formando un monolito polimérico. Las resinas con las microesferas fueron cortadas en delgadas películas con un Microtomo Reichert-Jung Stereo Star con una cuchilla de diamante, las muestras se colocaron en una rejilla y fueron expuestas a vapores de osmio para después ser observadas en el microscopio a condiciones de alto vacío con una energía de radiación de 90 kV y observadas a X40K de aumento.

### **3.5.2.3 Porosimetría por Sorción de Nitrógeno**

La distribución de tamaño de poro de las partículas fue medida usando el método BET con un Porosímetro Micromeritics ASAP 2000 nitrogen adsorption analyzer de la Unidad de Investigación en Catálisis (UNICAT) del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM. Las muestras fueron expuestas por 3 h a 120 °C bajo un flujo de N<sub>2</sub> y sujetos a un ciclo de presión que va de las 0 atm hasta 1 atm. El área superficial, el volumen de poro y el diámetro promedio de poro fueron calculados usando un paquete de computación Micromeritics software (versión 5.0).

### **3.5.2.4 % en Gel y Grado de Entrecruzamiento**

Antes de hacer la medición del grado de entrecruzamiento primero se procedió a medir el % en gel del polímero (fracción soluble e insoluble del polímero). Esto se realizó al pesar la cantidad de polímero colocado en el cartucho de papel filtro antes y después del lavado en el soxhlet<sup>61</sup>. También a partir del lavado se seleccionó el mejor disolvente tomando en cuenta los parámetros de solubilidad de los monómeros y disolventes, resultando el agua ser el disolvente más adecuado junto con el acetonitrilo ya que éste es el disolvente donde se realizó la síntesis y las pruebas de enlace Tabla 3.2.<sup>47</sup>

**Tabla 3.2** Parámetros de solubilidad de los solventes empleados<sup>63</sup>

Parámetro de Solubilidad	Acrilamida	Acetonitrilo	Metanol	Agua
$\delta$ [(cal/cm <sup>3</sup> ) <sup>1/2</sup> ]	12.7	11.9	14.5	23.4

Para asegurarnos que las condiciones para medir el grado de hinchamiento (entrecruzamiento) fueran las mismas que las realizadas para medir la capacidad de enlace, después de llevar a cabo la cinética de enlace (48 h en una solución de acetonitrilo/agua, 85:15), los polímeros fueron centrifugados por 10 min. El solvente fue extraído y el exceso de solvente se eliminó secando el polímero con un papel filtro. Los polímeros fueron pesados antes y después de la prueba para medir la cantidad de solvente absorbido y así obtener el grado de entrecruzamiento mediante la ecuación de Flory y Rehner<sup>36</sup>.

### 3.5.3 RECONOCIMIENTO MOLECULAR

#### 3.5.3.1 Capacidad de Enlace y Selectividad

20 mg de microesferas fueron colocadas en tubos eppendorf con 1 ml de una solución acuosa (85% MeCN / 15% agua D.I., v/v) de azúcar con una concentración inicial de 1 mg/ml. Esto se realizó en tres soluciones diferentes: 100% glucosa, 100% fructosa y una mezcla equimolar (50%-50%) de ambos azúcares. Los polímeros fueron mezclados y llevados al equilibrio mediante agitación en un porta tubos rotatorio durante 48 h. Las partículas fueron sedimentadas por centrifugación y el sobrenadante fue analizado por HPLC. La concentración de azúcar se determinó a partir de la curva patrón para calcular la cantidad de azúcar no enlazada en el polímero y por diferencia se determinó la cantidad de azúcar enlazada al polímero.

**La Capacidad de Enlace se define mediante la siguiente ecuación:**

$$\frac{g(\text{azúcar\_enlazada})}{g(\text{MIP})} = \frac{(C_i - C_f)V_s}{m_{\text{MIP}}}$$

donde:

$C_i$  = Concentración inicial de azúcar (mg/mL)

$C_f$  = Concentración final de azúcar (mg/mL)

$V_s$  = Volumen de la solución test (mL)

$m_{\text{MIP}}$  = Masa de polímero seco (mg)

### **3.5.3.2 Cinética de Enlace**

Los estudios de cinética se realizaron utilizando 100 mg de polímero. Incubados en 10 ml de una solución (85% MeCN/15% agua D.I.) con una mezcla (50-50% glucosa-fructosa) y una concentración inicial de cada uno de los azúcares de 1 mg/ml. Los polímeros se mezclaron mediante agitación en un porta tubos rotatorio por 48 h, se tomaron pequeñas alícuotas en diferentes tiempos y se analizaron por HPLC para medir la cantidad de azúcar no enlazada, y por diferencia se obtuvo la cantidad de glucosa y fructosa enlazada.

# CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 SÍNTESIS

Microesferas poliméricas altamente entrecruzadas fueron obtenidas vía radicales libres por la polimerización de acrilamida (AAM) con etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) en una solución acuosa de acetonitrilo (MeCN) con una conversión del 80%. El esquema general de la polimerización para la producción de estos MIPs se presenta en la Fig. 4.1. Primero se colocaron en la disolución la plantilla molecular (glucosa) y el monómero funcional (AAM) para formar el complejo monómero funcional-plantilla mediante interacciones por puentes de hidrógeno entre la plantilla y el monómero funcional (AAM) previo a la polimerización **(1)**, después se adicionaron el entrecruzante (EGDMA) junto con el azobisisobutironitrilo (AIBN) que es el iniciador de radicales libres, para comenzar la polimerización y fijar la posición de los grupos funcionales mediante la copolimerización de los monómeros funcionales (AAM) con el agente entrecruzante (EGDMA) **(2)**, después de haber realizado la polimerización la plantilla que quedo atrapada dentro de la matriz polimérica fue removida (disociación) mediante el lavado con agua por el método shoxlet para dejar un copolímero con cavidades complementarias en forma y funcionalidad a la plantilla. Estas cavidades fueron capaces de reenlazar glucosa (asociación) de manera selectiva con respecto a la fructosa al ser colocados en una solución con un mezcla de ambos azúcares **(3)**.

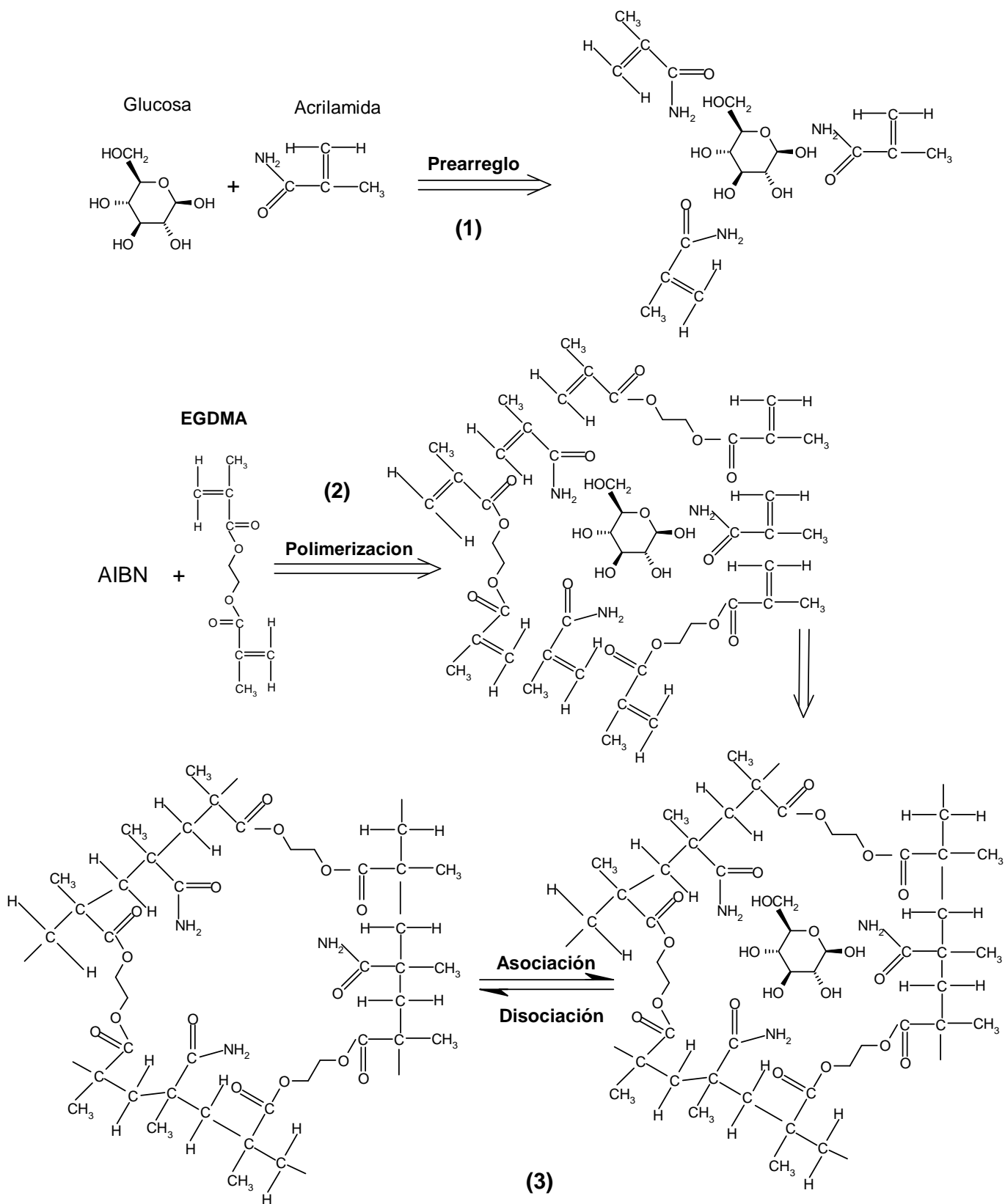
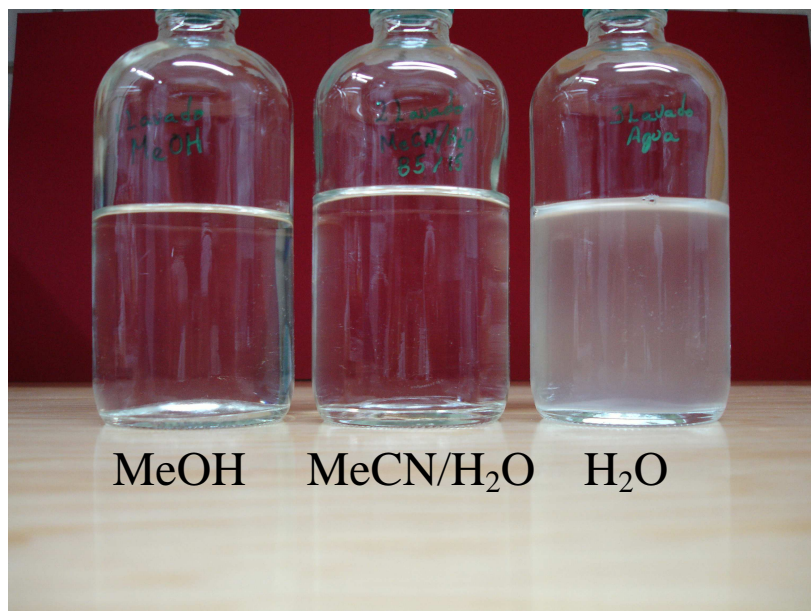


Figura 4.1 Modelo idealizado del proceso del estampado molecular de la glucosa

El crecimiento de las cadenas poliméricas que rodean a las moléculas de glucosa dieron paso a la formación de cavidades específicas (complementarias) en tamaño, forma y funcionalidad a la molécula de glucosa. Los polímeros se separaron por centrifugación y el sobrenadante se analizó por HPLC para medir la cantidad de glucosa libre y por diferencia obtener la cantidad de **glucosa estampada** en la matriz polimérica. Posteriormente los polímeros se secaron por liofilización y se pesaron para medir la cantidad de polímero obtenido.

Después de medir la cantidad de polímero obtenido, la plantilla fue removida de la red polimérica por lavados sucesivos del material. El método utilizado para el lavado de los polímeros fue el método soxhlet, esto con el fin de remover a la glucosa estampada de la red polimérica, polímero de bajo peso molecular y monómero sin reaccionar. Se probaron tres diferentes solventes (metanol, acetinitrilo/agua D.I.; 85/15 v/v y agua D.I.). A partir de estos lavados se calculó el % en Gel de los Polímeros (fracción soluble e insoluble de polímero), esto se hizo pesando la cantidad de polímero en el cartucho antes y después del lavado.

Dos tipos de polimerizaciones fueron realizadas usando AIBN como iniciador de radicales libres en una solución acuosa de MeCN/H<sub>2</sub>O D.I. (85/15, v/v). La relación molar de los reactivos y volúmenes de solvente usados para la síntesis de estos materiales fueron descritas en el capítulo anterior en la Tabla 3.1.



**Figura 4.2.** Apariencia de los solventes después del lavado de los polímeros.

Según se aprecia en la Fig. 4.2, el disolvente que removió polímero de bajo peso molecular fue el agua (recipiente derecho), y al medir la cantidad de glucosa presente estos tres disolventes de lavado por HPLC se obtuvo la cantidad de **glucosa removida** y por diferencia se obtuvo la cantidad de **glucosa no removida**, el que mayor cantidad de glucosa extrajo fue el agua, el cual por su polaridad es capaz de romper los puentes de hidrogeno formados entre las funcionalidades del polímero y la plantilla. Las cavidades que quedaron libres después del lavado fueron capaces de reenlazar selectivamente moléculas de glucosa al ser colocadas en una solución con una mezcla de glucosa y fructosa. En cambio el acetónitrilo/agua (recipiente de en medio) y el metanol (recipiente izquierdo) mostraron una extracción menor de glucosa (Fig. 4.3).

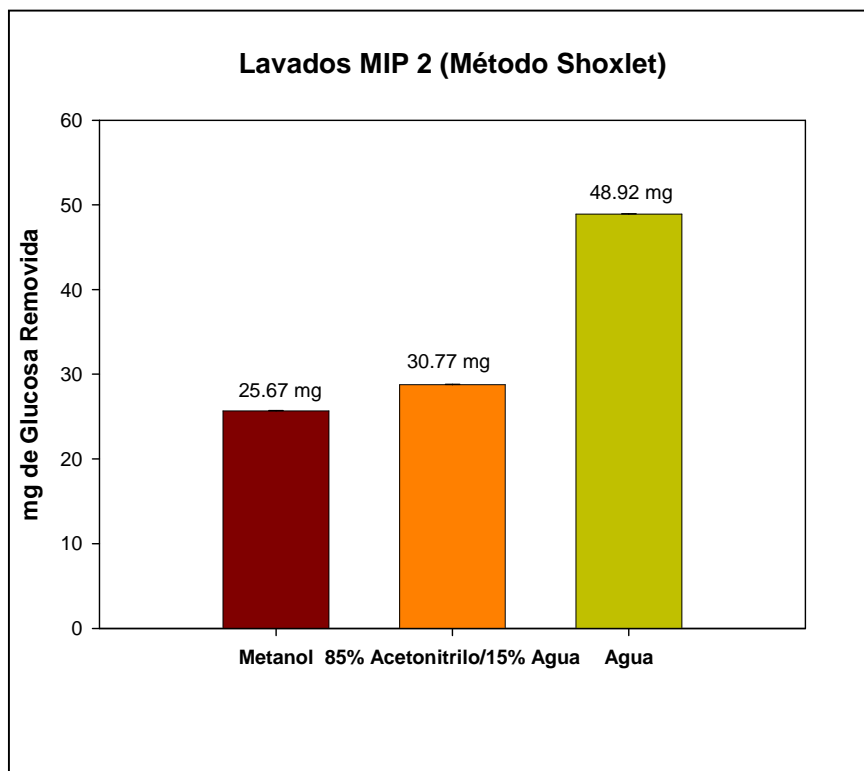


Figura 4.3 Cantidad de Glucosa removida utilizando diferentes solventes.

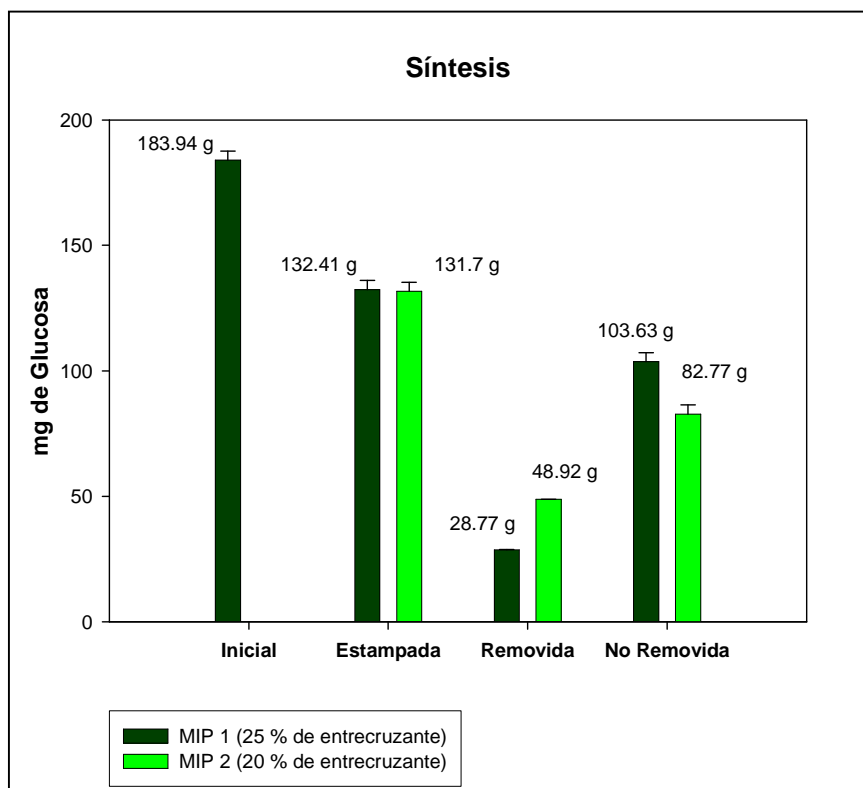
Después del lavado, los polímeros se secaron por liofilización para su posterior estudio. Los resultados de la síntesis y lavados (con agua) de los polímeros obtenidos se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Síntesis y lavado de los polímeros estampados molecularmente con glucosa

Paso	mg de Glucosa	
	MIP 1	MIP 2
Glucosa Inicial	183.94	183.94
Glucosa Estampada	132.41	131.7
Glucosa Removida	28.77	48.92
Glucosa no Removida	103.63	82.77

En la Tabla 4.1 y Fig. 4.4 se muestran las cantidades de glucosa presentes durante todo el proceso de estampado. Se comprobó, que efectivamente el polímero atrapa glucosa durante el paso de la polimerización, y que no toda la glucosa puede ser removida del polímero durante el proceso de lavado.





**Figura 4.4** Cantidad de glucosa en los diferentes pasos de la síntesis.

### 4.2 ESPECTROS IR

En los espectros IR (Fig. 4.5) de acrilamida (**I**), se pueden observar los diferentes grupos funcionales característicos de la molécula (N-H  $3310-3500\text{ cm}^{-1}$ ; CONH<sub>2</sub>  $1690\text{ cm}^{-1}$ ), además la presencia de grupos vinílicos (C=C  $1650-1670\text{ cm}^{-1}$ ) lo cual indica que se trata de monómero. En el espectro IR del etilenglicoldimetacrilato (**II**), se pueden observar los diferentes grupos funcionales característicos de la molécula (CCOOC  $1735\text{ cm}^{-1}$ ; C-O  $1050-1150\text{ cm}^{-1}$ ) de igual manera la presencia de grupos vinílicos (C=C  $1650-1670\text{ cm}^{-1}$ ) lo cual indica que se trata de monómero.

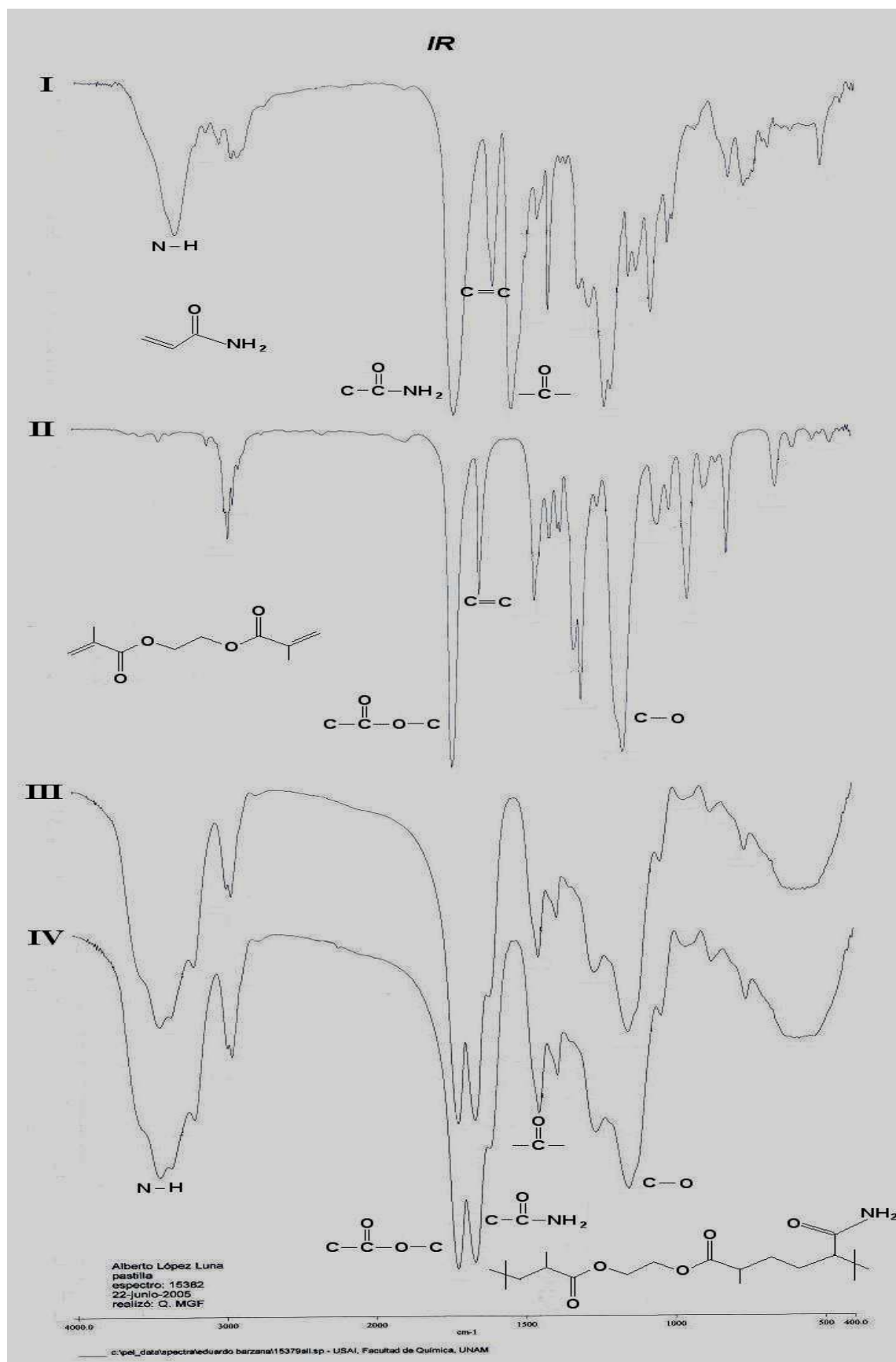
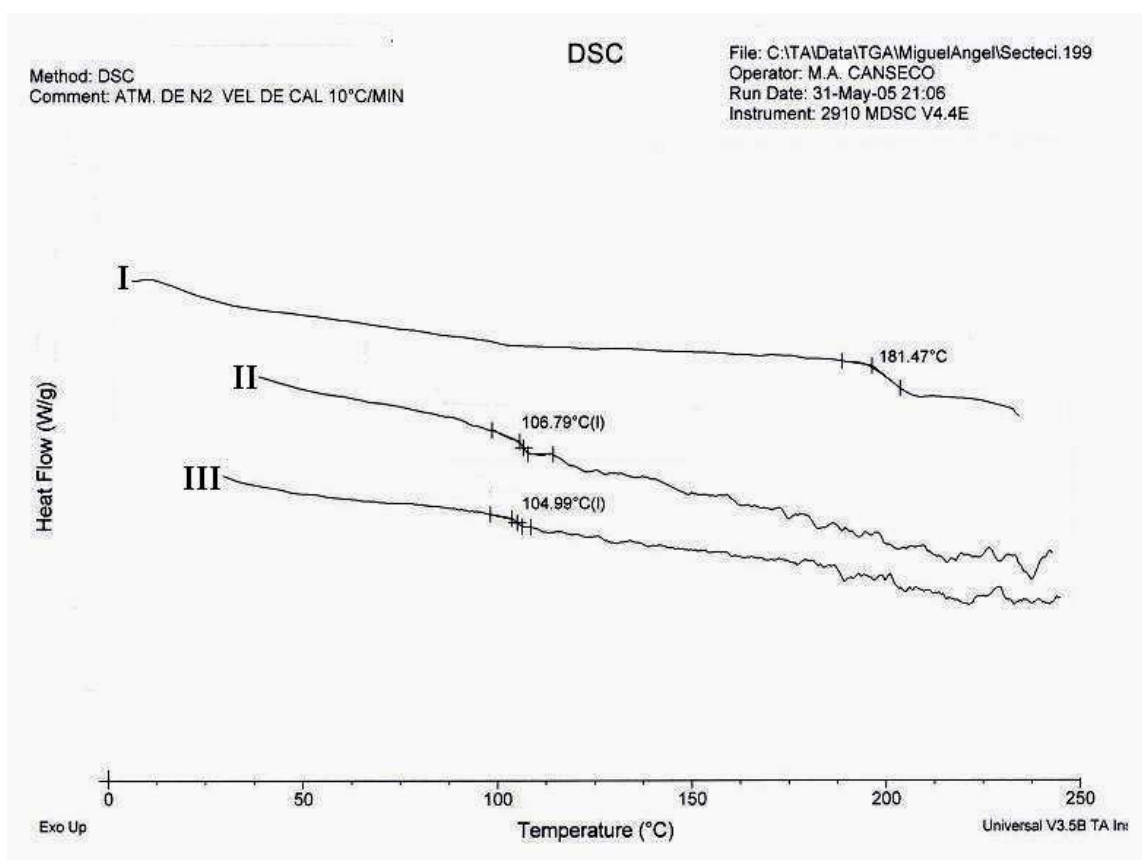


Figura 4.5 Espectro IR: I Acrilamida, II Etilenglicol dimetacrilato, III Polímero control y IV Polímero estampado

En el espectro IR de la poli(acrilamida-co-etilenglicoldimetacrilato) (Polímero Control) (**III**), se pueden observar los diferentes grupos funcionales característicos tanto de la acrilamida (N-H 3310-3500  $\text{cm}^{-1}$ ; CONH<sub>2</sub> 1690  $\text{cm}^{-1}$ ) como del etilenglico dimetacrilato (CCOOC 1735  $\text{cm}^{-1}$ ; C-O 1050-1150  $\text{cm}^{-1}$ ), y la ausencia de grupos vinílicos (C=C 1650-1670  $\text{cm}^{-1}$ ) indica que se trata de un copolímero; esto se confirmó mas adelante con el análisis térmico. El espectro IR de la Poli(acrilamida-co-etilenglicoldimetacrilato) estampada (MIP) (**IV**), no se percibe algún cambio en el espectro por la presencia de la glucosa atrapada en la matriz polimérica, debido a que los grupos característicos de la glucosa (O-H 3400-3640  $\text{cm}^{-1}$  y C-O 1050-1150  $\text{cm}^{-1}$ ) están en el mismo rango de absorción de los grupos característicos tanto de la acrilamida (N-H 3310-3500  $\text{cm}^{-1}$ ) como del etilenglicol dimetacrilato (C-O 1050-1150  $\text{cm}^{-1}$ ) por lo que no es posible hacer una distinción de esta molécula, de hecho el espectro es idéntico al del polímero control.

### 4.3 TERMOGRAMAS DSC

En los termogramas de DSC (Fig. 4.6) se puede ver la T<sub>g</sub> (Temperatura de transición vítrea) característica de la Poli(acrilamida) (**I**) que aparece a los 181.5°C. En el Termograma DSC del Poli(etilenglicol dimetacrilato) (**II**) se ve una T<sub>g</sub> aparente a los 106°C la cual es muy tenue. De hecho en los polímeros entrecruzados la T<sub>g</sub> va desapareciendo conforme aumenta el grado de entrecruzamiento ya que las cadenas poliméricas no pueden moverse por el alto grado de entrecruzamiento.

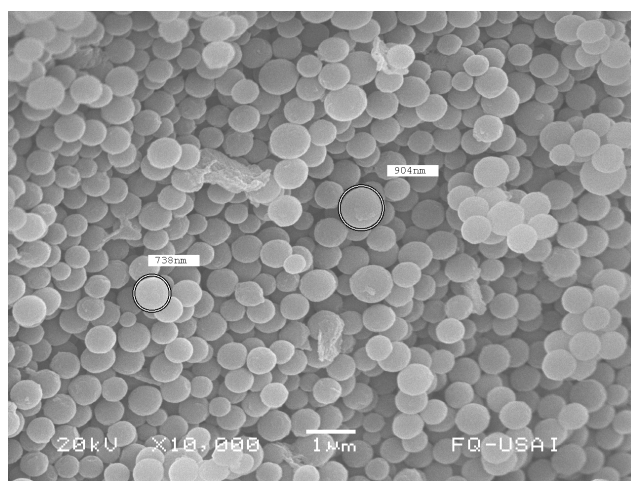


**Fig. 4.6** Termografía DSC : I Poli(acrilamida). II Poli(etilenglico dimetacrilato), III Poli(archilamida-co-etilenglicol dimetacrilato)

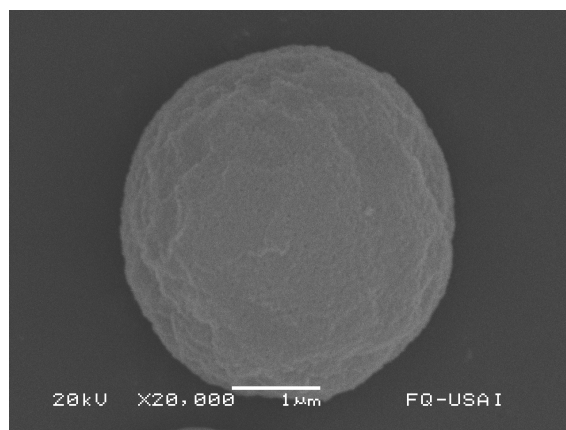
En el Termograma DSC del polímero resultante de la reacción entre el etilenglicoldimetacrilato y la acrilamida (**III**) se aprecia a una Tg aparente que aparece en el termograma del Poli(etilenglicol dimetacrilato) que bien podría ser la evaporación de moléculas de agua atrapadas en la matriz polimérica y la ausencia de la Tg característica de la Poli(acrilamida), esto significa que las unidades monoméricas de acrilamida fueron entrecruzadas covalentemente por el etilenglicol dimetacrilato, por lo que se trata de un copolímero, la Poli(acrilamida-co-etilenglicol dimetacrilato).

### **4.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM), MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM) y POROSIMETRÍA POR SORCIÓN DE NITRÓGENO**

La morfología de las microesferas sintetizadas se analizaron por SEM. La micrografía (Figura 4.7) muestra el tamaño de las microesferas sintetizadas las cuales tienen una distribución de tamaños que van desde los 300 nm hasta las 4 micras. La Figura 4.8 muestra una microesfera aislada del polímero estampado molecularmente MIP, la cual muestra una superficie rugosa.

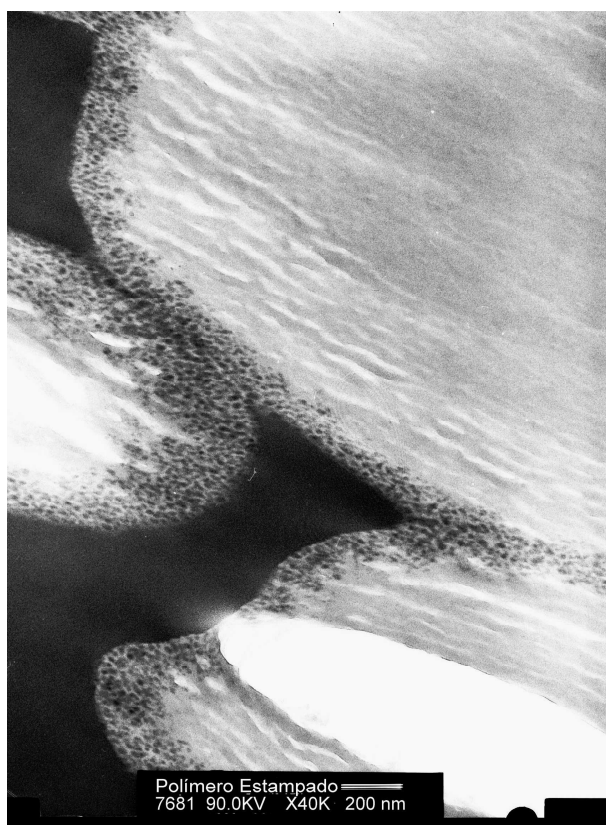


**Figura 4.7** Micrografía SEM de las microesferas MIP sintetizadas.



**Figura 4.8** Micrografía SEM de una micro esfera MIP aislada.

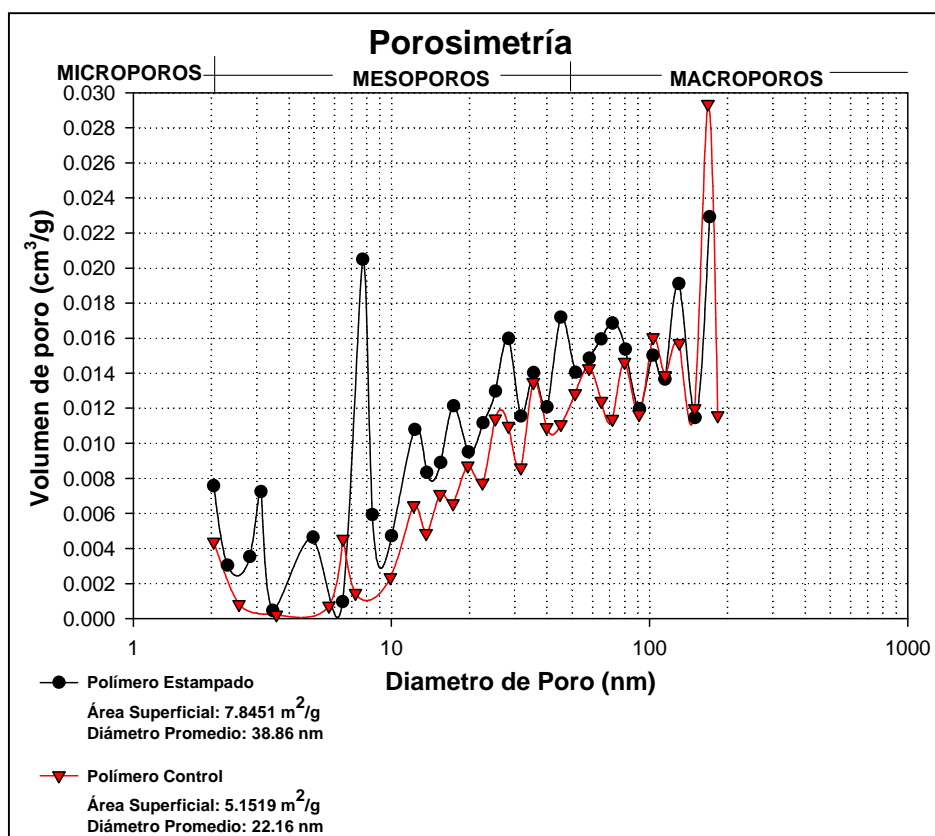
El análisis de las micrografías TEM mostrada en la Figura 4.9, demostraron la existencia de porosidades en la superficie de las microesferas menores a los 50 nm de ancho, tanto en el polímero control como en el estampado. Estas porosidades incrementan el área superficial de contacto favoreciendo la difusión de la molécula de interés hacia el interior de las microesferas.



**Figura 4.9** Micrografía TEM de las microesferas MIP sintetizadas

La existencia de estos poros en la superficie de la partícula fueron tentativamente demostrados por porosimetría de sorción de nitrógeno como se muestra en la Figura 4.10. Los polímeros obtenidos tienen un área superficial específica de  $5.15 \text{ m}^2/\text{g}$  (polímero control) y  $7.84 \text{ m}^2/\text{g}$  (polímero estampado), y un diámetro de poro promedio de  $22.16 \text{ nm}$  (polímero control) y  $38.86 \text{ nm}$  (polímero estampado). En esta gráfica se ve una amplia distribución de poros

que van desde los 2 nm hasta los 190 nm, por lo que el diámetro de poro se mueve en un amplio intervalo, de mesoporos a macroporos según la nomenclatura de la IUPAC. Sin embargo, la interpretación de la amplia distribución de poros entre 2 nm y 190 nm puede ser ambiguo, pudiendo ser atribuido al espacio intersticial entre las microesferas. No obstante, del análisis de ambas caracterizaciones, micrografías TEM y porosimetrías por intrusión de nitrógeno, se determinó la existencia de cierto grado de porosidad en la superficie de las microesferas, que bien podrían ser en parte las responsables de la retención de azúcar junto con la funcionalidades  $-NH_2$  en estas partículas.



**Figura 4.10** Distribución de tamaños de poro de las microesferas MIP sintetizadas.

### **4.5 % EN GEL Y GRADO DE ENTRECruzAMIENTO**

Antes de medir el grado de entrecruzamiento primero se midió el % en gel del polímero (fracción soluble e insoluble del polímero). Esto se realizó al pesar la cantidad de polímero colocado en el cartucho de papel filtro antes y después del lavado en el soxhlet. Para asegurarnos que las condiciones para medir el grado de hinchamiento (entrecruzamiento) fueran las mismas que las realizadas para medir la capacidad de enlace, después de realizar la cinética de enlace (48 h en una solución de acetonitrilo/agua, 85:15, v/v), los polímeros fueron centrifugados por 10 min. El disolvente fue extraído y el exceso de disolvente se eliminó secando el polímero con un papel filtro. Los polímeros fueron pesados antes y después de la prueba para medir la cantidad de disolvente absorbido y calcular el grado de entrecruzamiento.

En la Tabla 4.2 se muestran las fracciones solubles e insolubles de cada polímero después del lavado de los mismos con el método soxhlet.

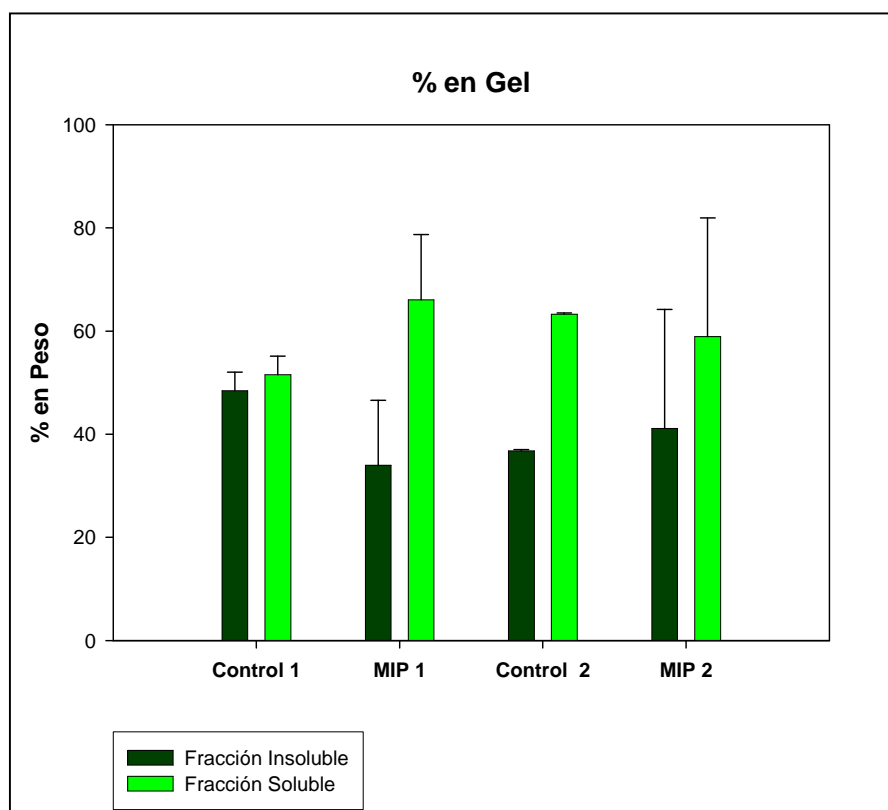
**Tabla 4.2** Fracción soluble e insoluble de los polímeros sintetizados

<b>Muestra</b>	<b>Polímero Peso Inicial (g)</b>	<b>Polímero Insoluble (g)</b>	<b>Polímero Soluble (g)</b>	<b>Fracción Insoluble %</b>	<b>Fracción Soluble %</b>
<b>Control 1</b>	0.3808	0.1941	0.1867	50.97	49.03
<b>Replica</b>	0.3821	0.1754	0.2067	45.90	54.10
<b>MIP 1</b>	0.4001	0.1715	0.2286	42.86	57.14
<b>Replica</b>	0.4317	0.108	0.3237	25.01	74.99
<b>Control 2</b>	0.3448	0.1274	0.2174	36.94	63.06
<b>Replica</b>	0.3595	0.1315	0.228	36.57	63.43
<b>MIP2</b>	0.3716	0.0922	0.2794	24.81	75.19
<b>Replica</b>	0.3641	0.209	0.1551	57.41	42.59

Como se puede ver en la Tabla 4.2 y Fig. 4.11, un gran porcentaje del polímero es soluble. Se ve claramente en algunos casos que menos del 50% del polímero obtenido es insolubles, y el resto es material muy poco entrecruzado o polímero de muy bajo peso molecular en donde no se llevo a cabo el proceso de estampado molecular por tratarse de polímero con una red muy abierta o de



cadenas lineales, por lo que la cantidad de material útil (polímero insoluble) se determinó como el 50 % de todo el polímero sintetizado.



**Figura. 4.11** Fracción soluble e insoluble de los polímeros sintetizados

Para calcular el % de entrecruzamiento con la ecuación derivada de Flory Rehner se necesitó el parámetro de interacción polímero/solvente y para esto se utilizó una ecuación semiempírica que se muestra a continuación:<sup>47</sup>

$$\chi = \beta_1 + \frac{V_1}{RT}(\delta_1 - \delta_2)^2$$

donde:

$\chi$  = Parámetro de interacción

$\delta_1$  = parámetro de solubilidad del solvente

$\delta_2$  = parámetro de solubilidad del polímero

$\beta_1$  = constante de la red que generalmente es: 0.35

R = cte. de los gases

$V_1$  = volumen molar del solvente

T = temperatura absoluta

Usando los datos de la Tabla 4.3 y las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos descritos. Se obtuvo un parámetro de interacción entre el polímero y el MeCN de  $\chi = 0.412$ . De aquí se utilizó la ecuación de Flory y Rehner que en su forma sustituida se expresa de la siguiente manera:

**Tabla 4.3** Constantes utilizadas para calcular el grado de entrecruzamiento.

$\beta_1$	R(cal/mol K)	T [K]	$V_1(\text{cm}^3/\text{mol})$	$\delta_1[\text{cal}/\text{cm}^3]^{0.5}$	$\delta_2[\text{cal}/\text{cm}^3]^{0.5}$
0.35	1.987	298.15	57.5	11.9	12.7

$$\bar{M}_c = \frac{\rho V_0 V_r^{1/3}}{-[\ln(1 - V_r) + V_r + \chi V_r^2]}$$

donde:

$M_c$  = peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento (g/g mol).

$V_r$  = fracción volumen del hule, en la muestra de hule hinchado con solvente

$\chi$  = parámetro de interacción Flory-Huggins entre polímero y solvente.

$\rho$  = densidad del hule, sin aditivos (g/cm<sup>3</sup>).

$V_0$  = volumen molar del solvente (cm<sup>3</sup>/g mol).

Densidad del Hule sin aditivos = 0.1586 g/cm<sup>3</sup>

Densidad del MeCN = 0.7138 g/cm<sup>3</sup>

Volumen de solvente usado 10 ml      1ml = 1 cm<sup>3</sup>

$\chi = 0.412$

$V_0 = 57.5 \text{ cm}^3/\text{mol}$

Peso Solvente = Peso Final – Peso Inicial

Volumen del Polímero = Peso del Polímero / Densidad del Polímero

Volumen Solvente = Peso Solvente / Densidad Solvente

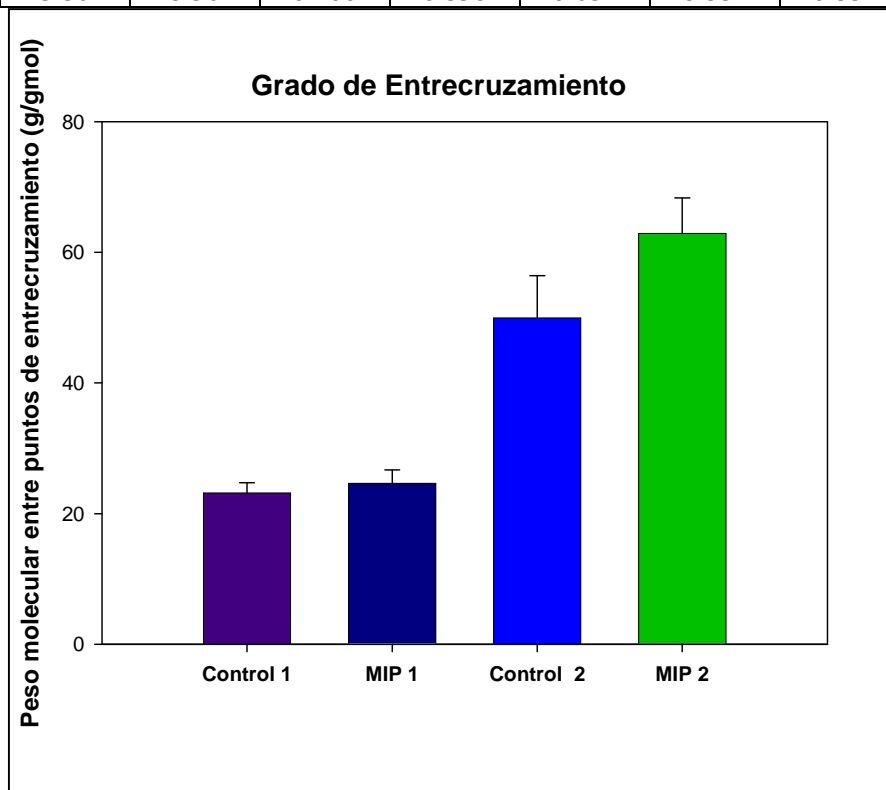
$V_r = \text{Volumen del Polímero} / (\text{Volumen del Polímero} + \text{Volumen del MeCN})$

## Capítulo IV: Resultados y Discusión

De la aplicación de estas ecuaciones se obtuvo el grado de entrecruzamiento de los polímeros sintetizados (Tabla 4.4 y Fig. 4.12). Hay que aclarar que la  $M_c$  (peso promedio entre puntos de entrecruzamiento g/gmol) son los gramos de polímero entrecruzado/ gramos mol entre puntos de entrecruzamiento, por lo que la cantidad de  $M_c$  es inversamente proporcional al grado de entrecruzamiento del polímero, es decir entre más cerrada sea la red molecular que se forma durante el proceso de entrecruzamiento menor será la cantidad numérica de  $M_c$ .

**Tabla 4.4** Grado de Entrecruzamiento de los polímeros sintetizados.

Muestra	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Peso Polímero (g)	Peso Solvente (g)	Volumen Polímero (cm <sup>3</sup> )	Volumen Solvente (cm <sup>3</sup> )	Vr	Mc [g/gmol]
<b>Control 1</b> <b>Replica</b>	5.58	5.73	0.091	0.147	0.575	0.206	0.736	22.08
	5.51	5.69	0.100	0.176	0.632	0.247	0.718	24.26
<b>MIP 1</b> <b>Replica</b>	5.57	5.73	0.094	0.159	0.593	0.222	0.727	23.17
	5.51	5.70	0.100	0.189	0.634	0.265	0.705	26.08
<b>Control 2</b> <b>Replica</b>	5.58	5.90	0.092	0.315	0.580	0.441	0.568	54.55
	5.62	5.92	0.101	0.300	0.636	0.421	0.601	45.37
<b>MIP 2</b> <b>Replica</b>	5.59	5.95	0.098	0.356	0.619	0.499	0.553	59.09
	5.56	5.96	0.100	0.398	0.634	0.557	0.532	66.74



**Figura 4.12** Grado de Entrecruzamiento de los polímeros sintetizados

En el análisis de los datos se observa una disminución en el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento conforme la relación de entrecruzante y monómero funcional aumenta. Sin embargo estos datos no son confiables, ya que si bien la tendencia es la esperada, las cantidades numéricas no son congruentes con las relaciones de entrecruzante empleados, de hecho teniendo en cuenta únicamente el tamaño del entrecruzante el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento mínimo teórico que se puede alcanzar es de 104 g/gmol el cual es un valor mucho mayor a cualquiera de los datos aquí presentados. Por lo que concluimos que estos valores no son los reales

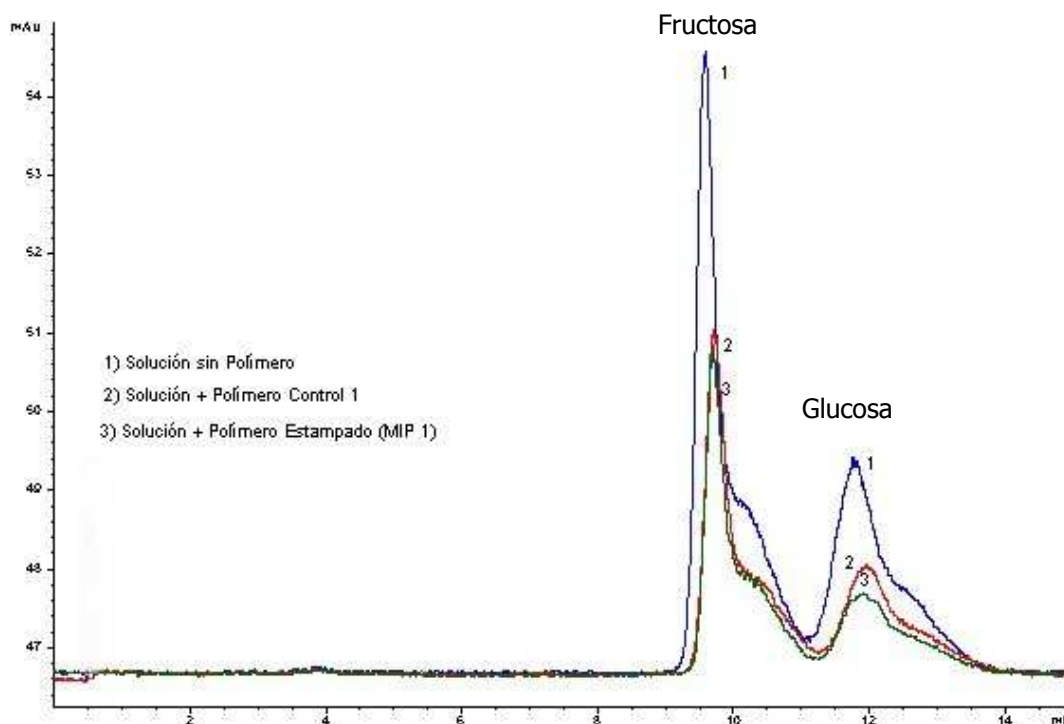
### **4.6 CAPACIDAD DE ENLACE, SELECTIVIDAD Y CINÉTICA DE ENLACE**

Los polímeros (fracción insoluble) se colocaron en una mezcla de MeCN / agua D.I. (85%/15%, v/v) con tres soluciones diferentes: 100% glucosa, 100% fructosa y una mezcla equimolar (50%-50%) de ambos azúcares, y se dejaron incubando por 48 h en un rotor de tubos para medir su Capacidad de Enlace, Selectividad y Cinética de Enlace, al analizar la cantidad de azúcar libre en el sobrenadante por HPLC (Figura 4.13).



**Figura 4.13** Rotor de tubos utilizado en el proceso de incubación.

Los polímeros estampados mostraron un enlace preferencial por la glucosa, y esto se pudo observar al analizar el sobrenadante después de haber incubado a los polímeros en una solución con una mezcla de ambos azúcares (glucosa-fructosa) Figura 4.14.



**Figura 4.14** Cromatograma de los azúcares que quedaron en el sobrenadante después de incubar a los polímeros en una solución de acetonitrilo/agua (85:15) con una mezcla de glucosa y fructosa 50-50% en peso.

### 4.6.1 Capacidad de enlace de los MIPs sintetizados

La capacidad de enlace de los polímeros estampados y de los controles se analizaron con soluciones de azúcares. Las capacidades de enlace de los MIPs en soluciones de glucosa en mezclas de MeCN/H<sub>2</sub>O así como soluciones de fructosa en el mismo solvente son descritas en la Tabla 4.5 y Fig. 4.15. La selectividad ( $\alpha$ ) se define como:  $\alpha = \text{glucosa enlazada (mg)} / \text{fructosa enlazada (mg)}$ .

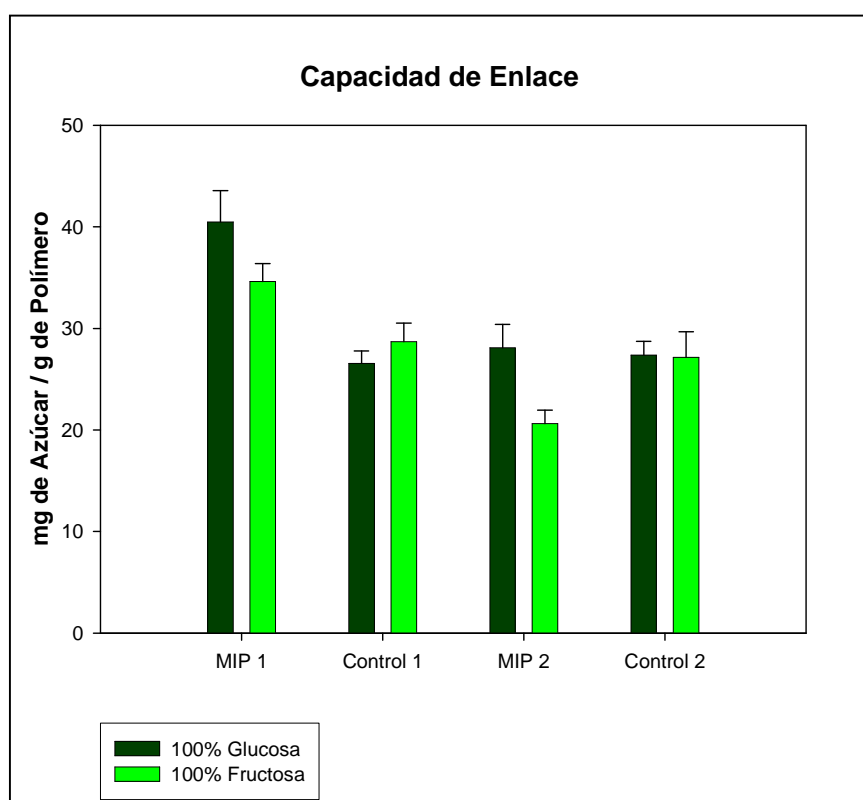
## Capítulo IV: Resultados y Discusión

**Tabla 4.5** Capacidad de enlace (mg de azúcar enlazada/g de polímero seco)

Polímero	100% Glucosa	100% Fructosa	$\alpha$
MIP 1	40.47	34.63	1.16
Control 1	26.54	28.68	0.92
$\alpha$	1.52	1.20	

MIP 2	28.08	20.61	1.36
Control 2	27.35	27.13	1.008
$\alpha$	1.02	0.75	

El enlace de los azúcares fueron medidos en una solución estándar preparada en acetonitrilo/ H<sub>2</sub>O DI (85:15).



**Figura. 4.15** Capacidad de enlace de los polímeros en una solución de acetonitrilo/agua (85:15) con 100% glucosa y 100% fructosa .

Los polímeros no estampados (NIP) fueron usados como control para determinar la efectividad del proceso de estampado. La capacidad de enlace del azúcar está referida como miligramos de azúcar enlazada por gramos de polímero seco. De manera alterna, la selectividad de enlace de los polímeros sintetizados se investigaron en soluciones acuosas de MeCN/H<sub>2</sub>O con una mezcla

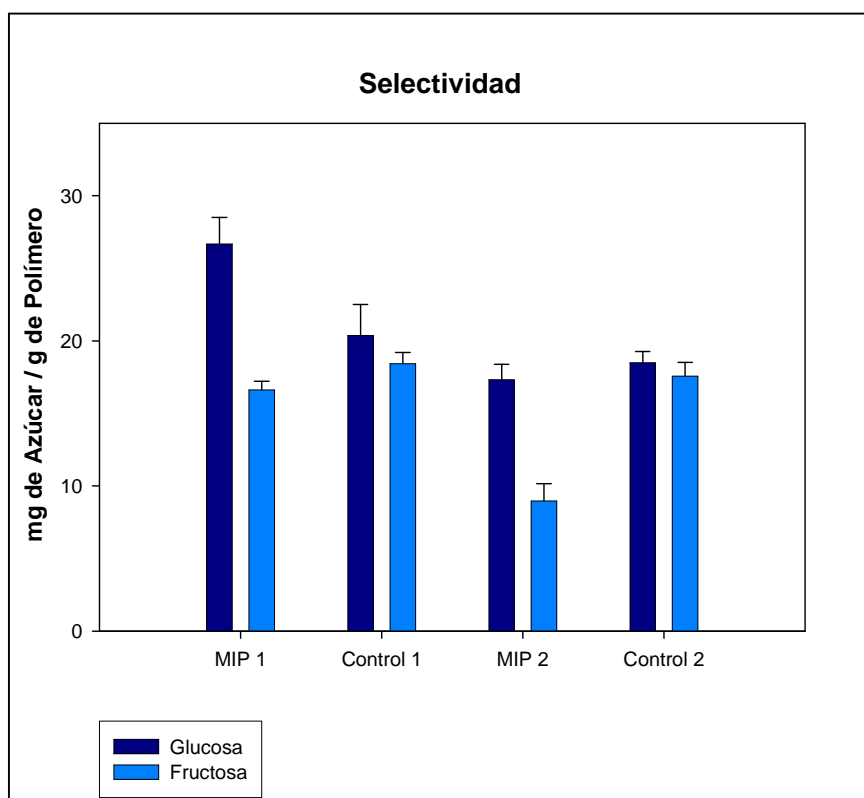
## Capítulo IV: Resultados y Discusión

de azúcares (glucosa-fructosa) para determinar si los polímeros estampados pueden discriminar entre los dos azúcares Tabla 4.6 y Fig. 4.16.

**Tabla 4.6** Selectividad de enlace de los polímeros sintetizados (mg de azúcar enlazada/g de polímero seco)

Muestra	50-50% glucosa-fructosa		$\alpha$
	Glucosa	Fructosa	
<b>MIP 1</b>	26.68	16.61	1.60
<b>Control 1</b>	20.36	18.43	1.10
$\alpha$	1.31	0.90	
<b>MIP 2</b>	17.32	8.96	1.93
<b>Control 2</b>	18.50	17.57	1.05
$\alpha$	0.93	0.50	

El enlace de los azúcares fueron medidos en una solución estándar preparada en 85% acetonitrilo/15% H<sub>2</sub>O DI.



**Figura. 4.16** Selectividad de los polímeros en una solución de acetonitrilo/agua (85:15) con una mezcla de glucosa-fructosa 50-50% en peso.

Como está indicado en la Tabla 4.5 y en la Tabla 4.6, los polímeros estampados muestran afinidad por la glucosa con respecto a la fructosa. La máxima cantidad de glucosa enlazada por los MIPs fue de 40 mg por gramo de polímero seco cuando éste fue colocado en una solución de 100% glucosa en MeCN/H<sub>2</sub>O, y casi el doble de glucosa es enlazada con respecto a la fructosa, para una solución de ambos azúcares. El material no estampado, NIP, también mostró capacidad de enlace comparado a su análogo estampado, pero con ausencia de selectividad de estos últimos. El factor de selectividad, ( $\alpha$  = glucosa enlazada (mg) / fructosa enlazada (mg)) en la Tabla 4.5, indica que éste es de 1.60 a 1.93 veces más específico para glucosa en el MIP. Los resultados experimentales demostraron una notable especificidad para la glucosa en la solución acuosa de MeCN. Los datos también indican que los MIPs son capaces de separar glucosa cuando son colocados en una solución compuesta de una mezcla equimolecular de ambos azúcares. Por otro lado, la comparación del factor de separación ( $\alpha$ ) para ambos MIP 1 y MIP 2 señalan que una disminución en el grado de entrecruzamiento de la red polimérica mejora la selectividad para glucosa. Se observa una alta especificidad para glucosa en el MIP 2 (menos entrecruzado) que en el MIP 1 (más entrecruzado). Esto indica que el grado de entrecruzamiento es un factor importante en estos materiales.

Después de analizar los datos obtenidos por SEM, TEM, porosimetría, capacidad y selectividad de enlace, se puede concluir que los NIPs son capaces de enlazar glucosa y fructosa cuantitativamente al igual que los MIPs en la superficie porosa de las microesferas, pero a diferencia de estos últimos, los NIPs no muestran una selectividad debido a que en ellos no se formaron cavidades específicas para glucosa por el proceso de estampado.



### 4.6.2 Cinética de enlace

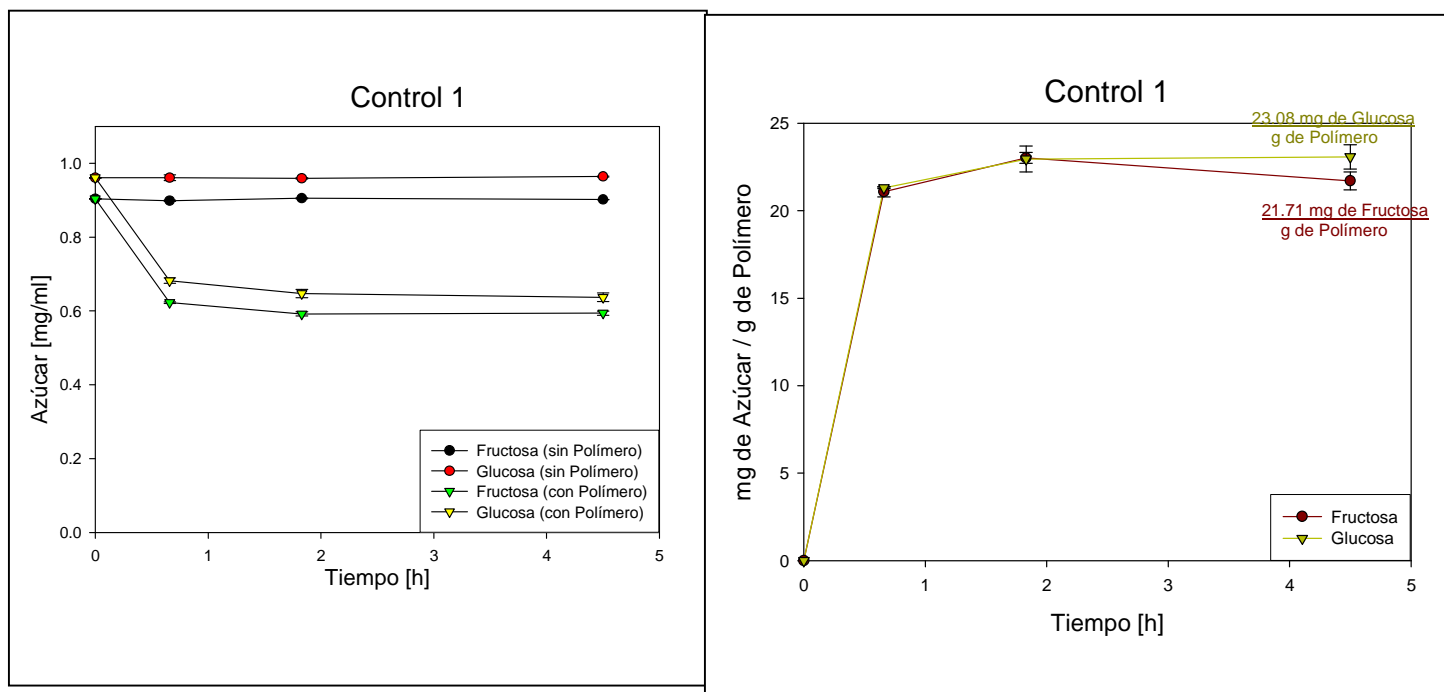
En la Tabla 4.7 y Figuras 4.17-4.20 se muestran las cinéticas de enlace de los MIPs en una solución acuosa de MeCN/H<sub>2</sub>O con una mezcla equimolar de glucosa/fructosa (1mg/ml), mediante un seguimiento de las concentraciones por la técnica del HPLC. Se observa que las micro-esferas muestran una rápida velocidad de adsorción. De hecho en los primeros 30 min prácticamente se alcanza el equilibrio. No se observan variaciones en las velocidades de adsorción entre los MIPs y los polímeros control (no estampados), no obstante la afinidad por la glucosa por parte de los MIPs fue alta con respecto a la fructosa.

**Tabla 4.7** Azúcar enlazada a las 4.5 h de incubación (mg de azúcar/g de polímero)

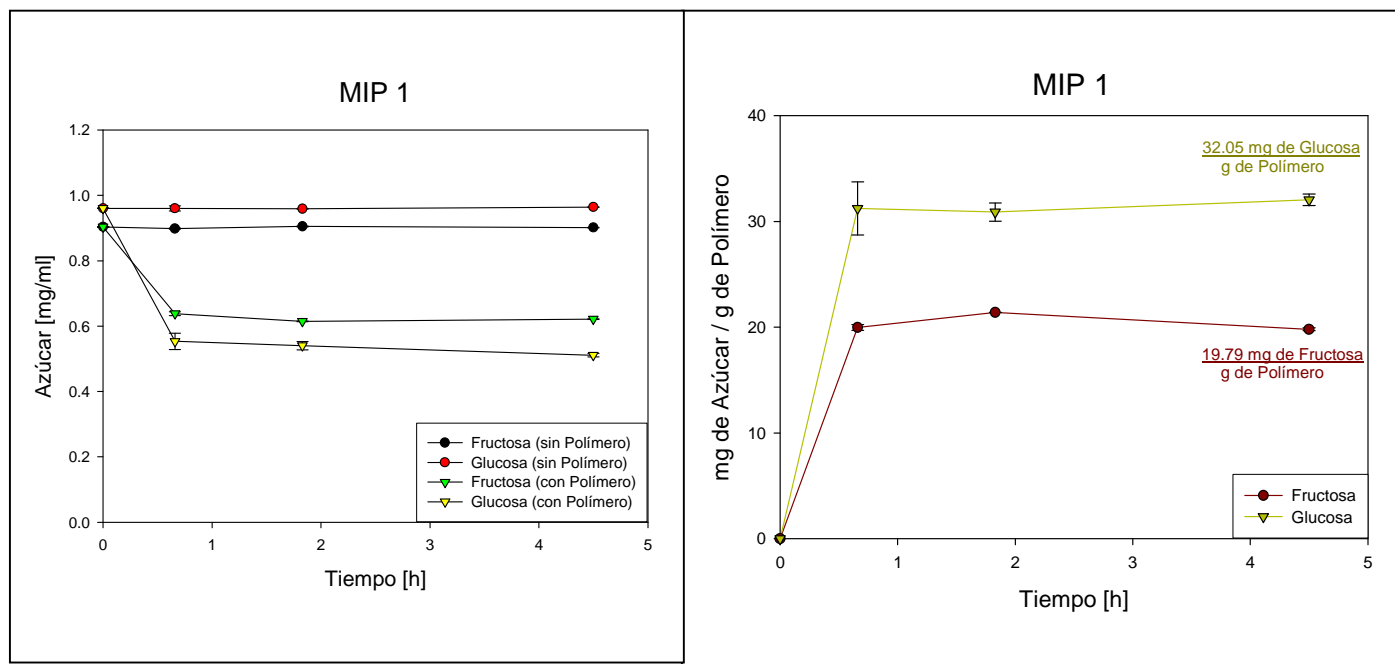
Muestra	50-50% glucosa-fructosa		$\alpha$
	Glucosa	Fructosa	
<b>MIP 1</b>	32.05	19.79	1.61
<b>Control 1</b>	23.08	21.71	1.06
<b><math>\alpha</math></b>	1.38	0.91	
<b>MIP 2</b>	23.62	9.8	2.41
<b>Control 2</b>	22.21	20.79	1.06
<b><math>\alpha</math></b>	1.06	0.47	

El enlace de los azúcares fueron medidos en una solución estándar preparada en 85% acetonitrilo/15% H<sub>2</sub>O DI.

## Capítulo IV: Resultados y Discusión



**Figura 4.17** a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos, b) mg de azúcar enlazada a diferentes tiempos, polímero control 1



**Figura 4.18** a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos, b) mg de azúcar enlazada a diferentes tiempos, MIP 1

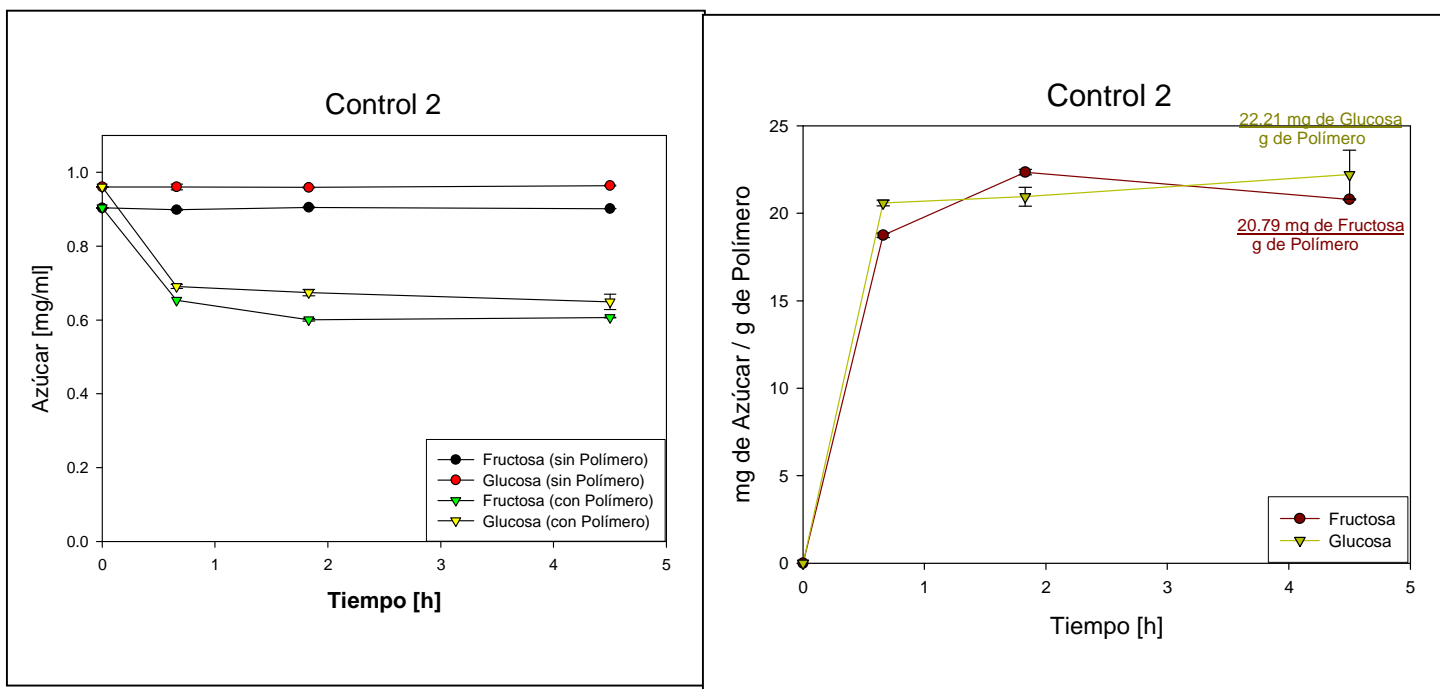


Figura. 4.19 a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos, b) mg de azúcar enlazada a diferentes tiempos, polímero control 2

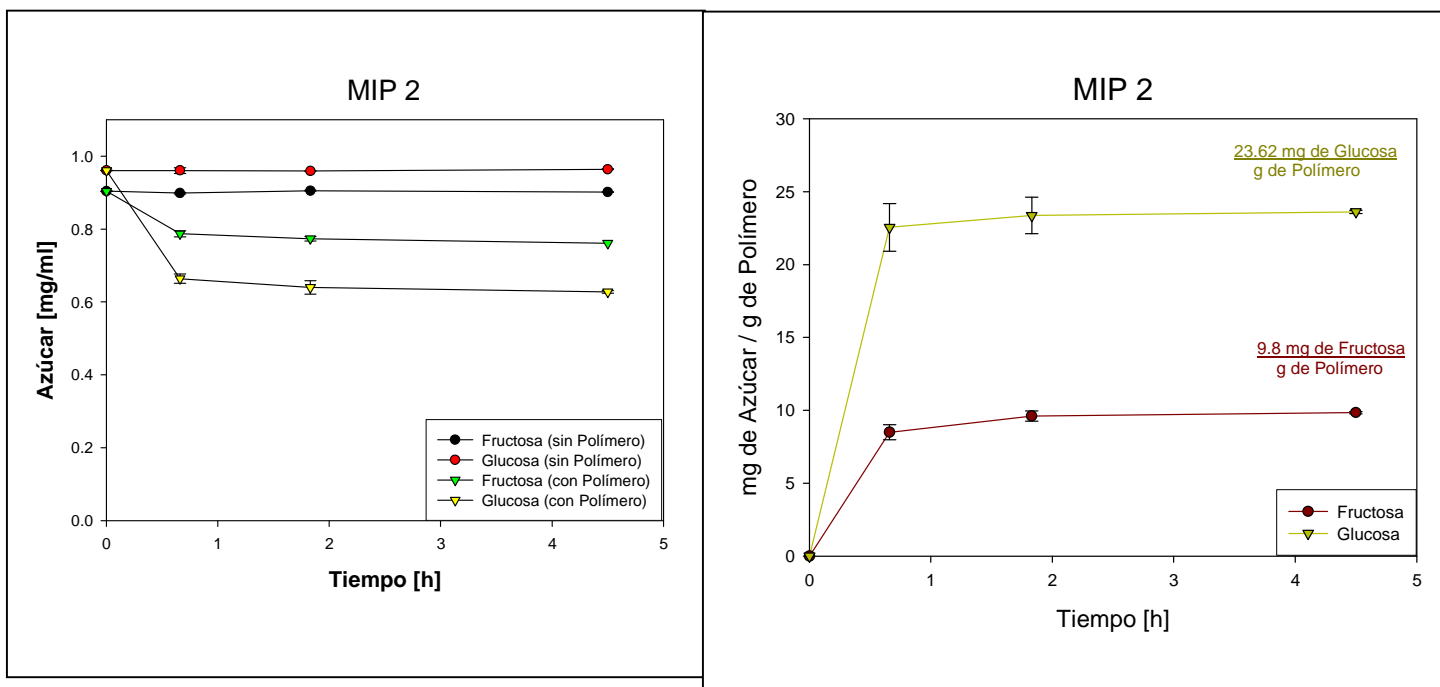


Figura 4.20 a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos, b) mg de azúcar enlazada a diferentes tiempos, MIP 2

La afinidad por la glucosa en los MIPs sobre los polímeros control (no estampados) NIPs, puede ser explicada debido a la generación de sitios de enlace específicos para glucosa en la matriz polimérica durante su polimerización. La afinidad de estas cavidades para la plantilla molecular explica las variaciones observadas en las capacidades de enlace y especificidades.

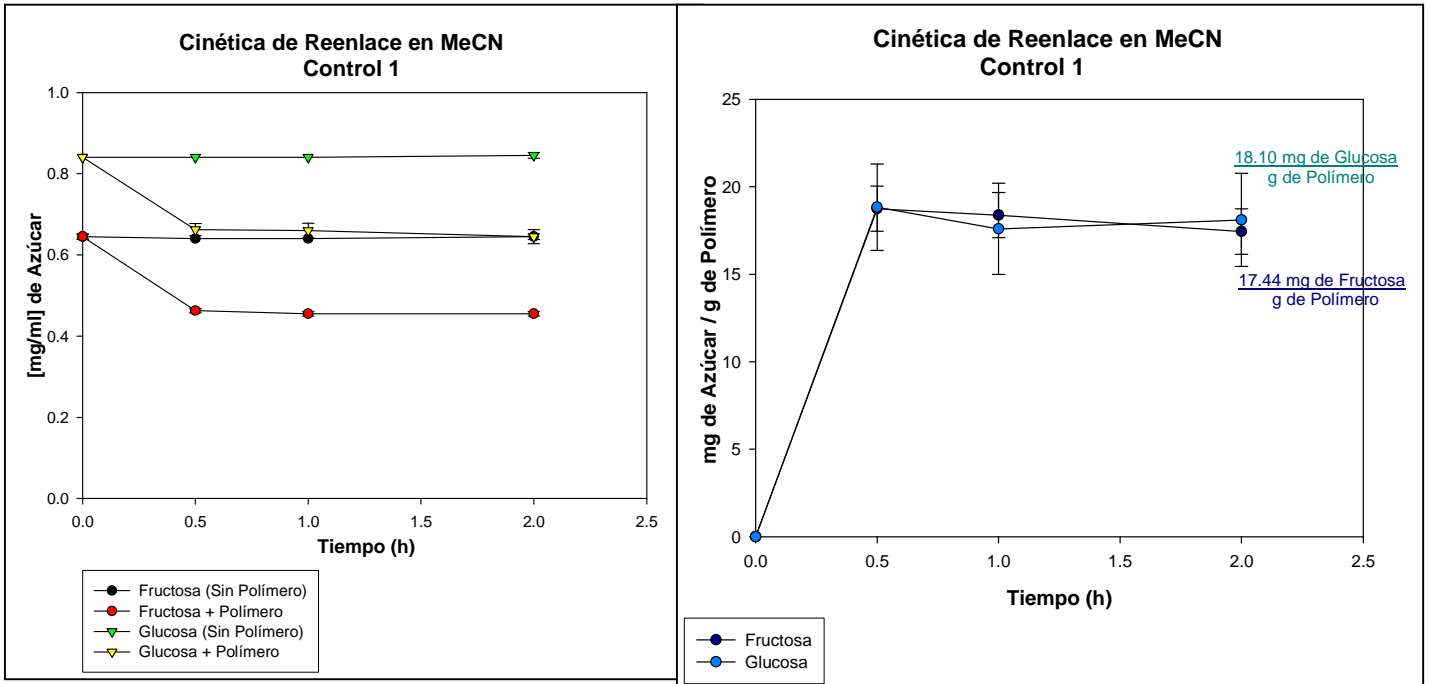
Otro problema clave relacionado con esta tecnología es la relajación conformacional del sitio de enlace que surge cuando la plantilla es disociada de la matriz polimérica. Usualmente se esperaría que las cavidades estampadas puedan ser distorsionadas debido al hinchamiento de los MIPs cuando se hace la remoción de la plantilla mediante un disolvente. Sin embargo, la remoción de la plantilla molecular en condiciones suaves con agua pura es efectiva y se supone que esto no cambia la estructura de las cavidades. Como resultado, el material obtenido al final del proceso sigue teniendo una marcada selectividad por la glucosa. Los polímeros fueron nuevamente lavados e incubados en una solución de acetonitrilo/agua con una mezcla de glucosa-fructosa, para determinar si los polímeros son reutilizables, los resultados se muestran en la Tabla 4.8.

**Tabla 4.8** Azúcar enlazada a las 4.5 h de Incubación con polímero reutilizado (mg de azúcar/g de polímero)

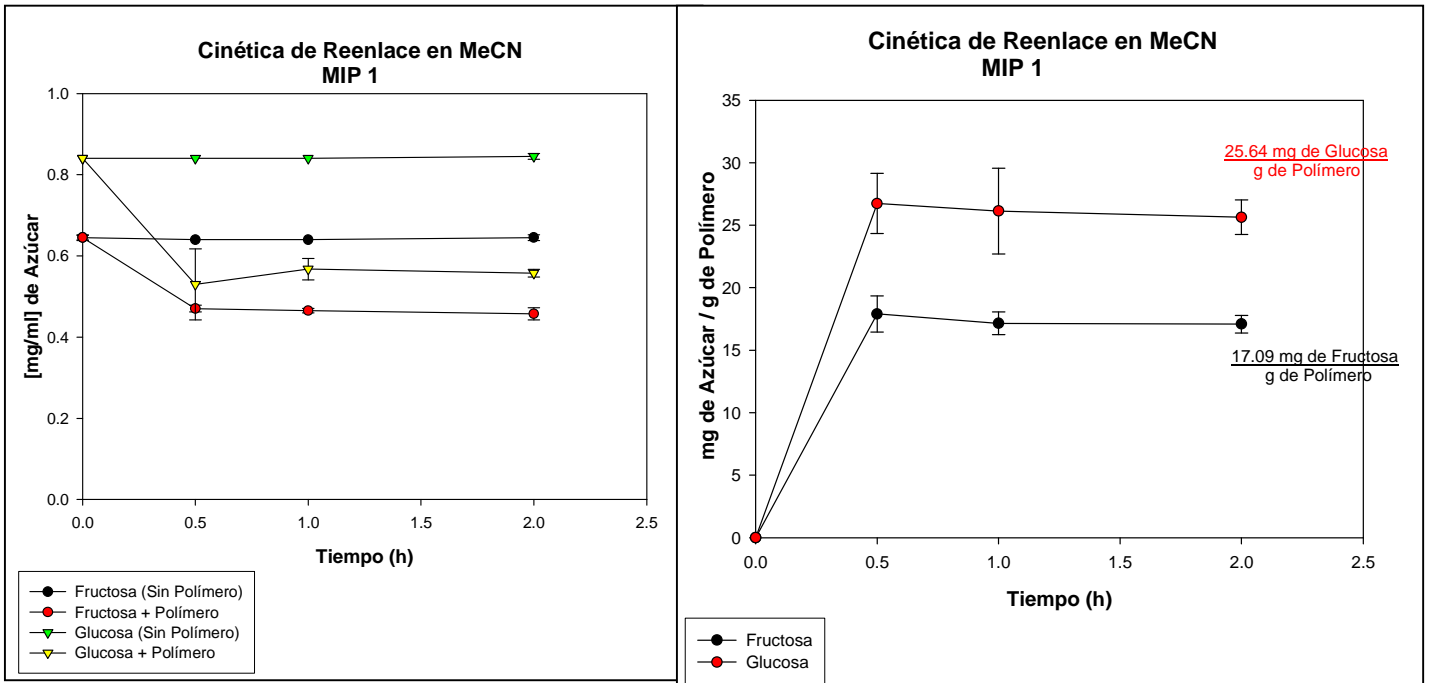
Muestra	50-50% glucosa-fructosa		$\alpha$
	Glucosa	Fructosa	
<b>MIP 1</b>	25.64	17.09	1.50
<b>Control 1</b>	18.10	17.44	1.03
<b><math>\alpha</math></b>	1.41	0.97	
<b>MIP 2</b>	16.49	7.73	2.13
<b>Control 2</b>	17.47	16.20	1.07
<b><math>\alpha</math></b>	0.94	0.47	

El enlace de los azúcares fueron medidos en una solución estándar preparada en 85% acetonitrilo/15% H<sub>2</sub>O DI.

## Capítulo IV: Resultados y Discusión

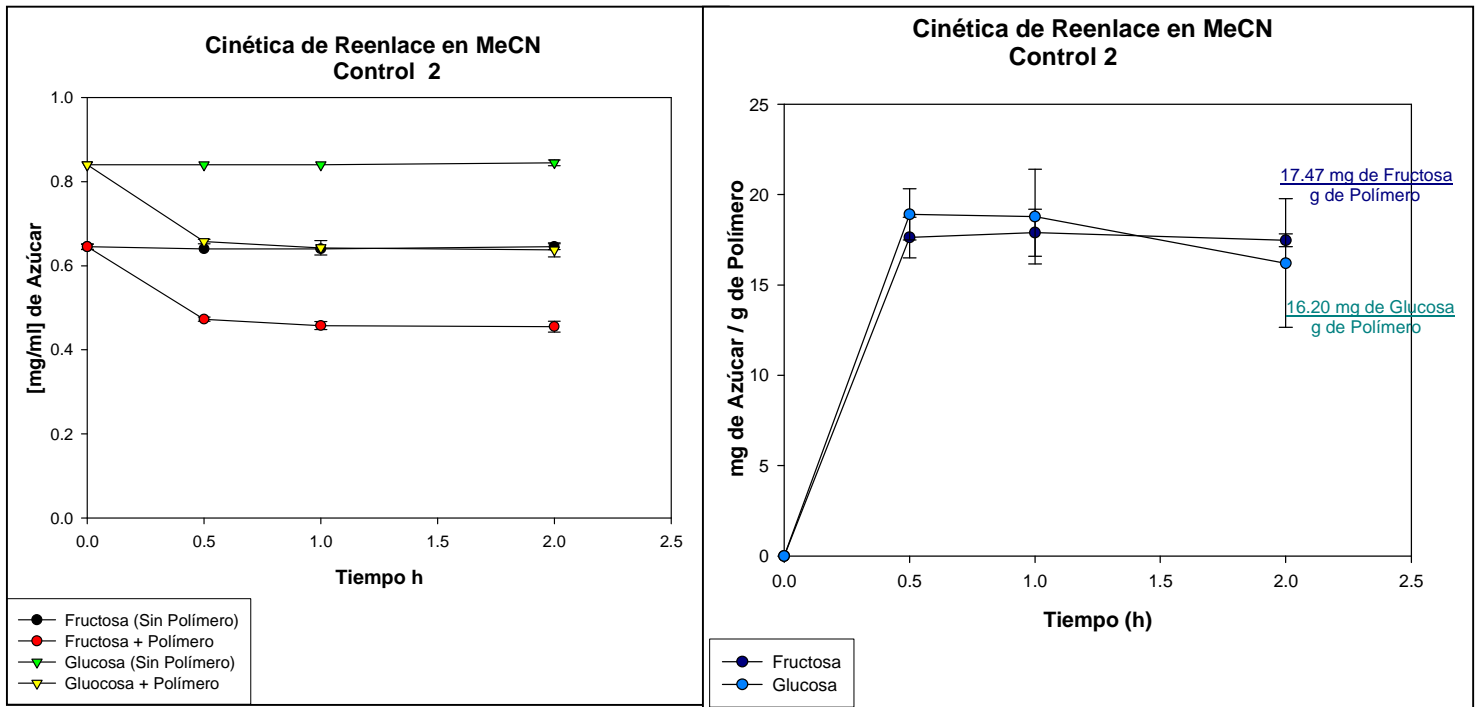


**Figura 4.21** a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos, b) mg de azúcar reenlazada a diferentes tiempos, polímero control 1

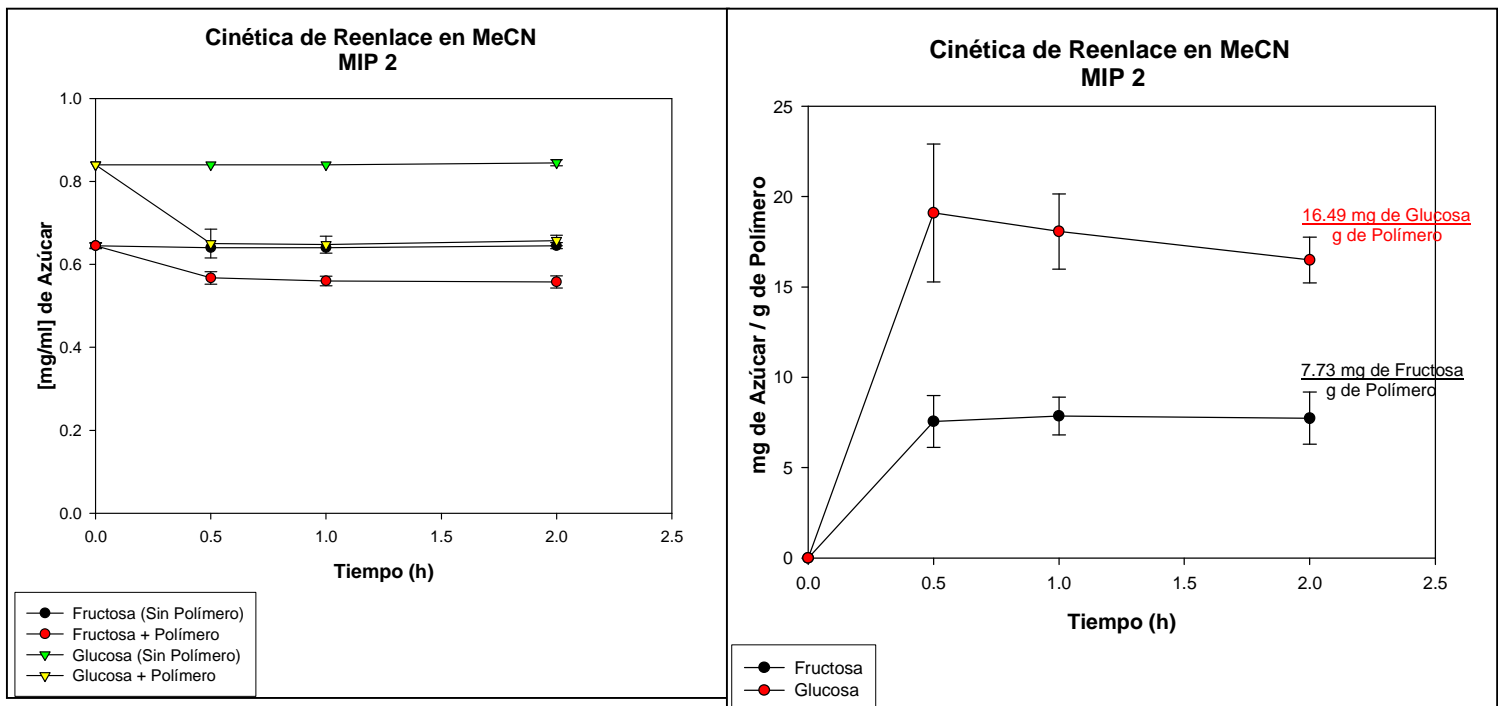


**Figura 4.22** a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos, b) mg de azúcar reenlazada a diferentes tiempos, MIP 1

## Capítulo IV: Resultados y Discusión



**Figura 4.23** a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos, b) mg de azúcar reenlazada a diferentes tiempos, polímero control 2



**Figura. 4.24** a) Concentración de azúcares en una mezcla a diferentes tiempos, b) mg de azúcar reenlazada a diferentes tiempos, MIP 2

En la Tabla 4.8 y Figuras 4.21-4.24 se observa que los polímeros son reutilizables con la misma cinética de saturación, pero hay disminución en la cantidad de azúcar enlazada tanto de glucosa como de fructosa en aproximadamente un 30 % en general (Tabla 4.9). Sin embargo la selectividad se mantiene constante.

**Tabla 4.9** Eficiencia de Reenlace

<b>Eficiencia de Reenlace</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Fructosa</b>
<b>MIP 1</b>	-25 %	-15 %
<b>Control 1</b>	-27 %	-25 %
<b>MIP 2</b>	-43 %	-26 %
<b>Control 2</b>	-27 %	-28 %

### CONCLUSIONES

Una alta selectividad en la retención de la molécula de glucosa frente a la molécula de fructosa en los MIPs sintetizados se obtuvo mediante polimerización por radicales libres de una solución diluida de monómero en la presencia de una plantilla molecular (glucosa) y un agente entrecruzante. Las concentraciones de disolvente y reactivos que permiten el estampado molecular de glucosa han sido optimizados. Las matrices poliméricas estampadas molecularmente tienen forma de micropartículas uniformes con una estructura porosa en la superficie. Los estudios de capacidad de enlace de glucosa y fructosa en una solución acuosa de acetonitrilo con una mezcla de azúcares indican que las cavidades formadas, gracias al estampado con glucosa en las microesferas, muestran afinidad y especificidad por la glucosa en mezclas de glucosa y fructosa en un ambiente de enlace competitivo. En términos generales, los resultados obtenidos son buenos y muy alentadores, ya que si bien existen reporte previos de polímeros con capacidades de enlace y selectividades en solución acuosa superiores a los polímeros sintetizados en este trabajo, estos, por su forma irregular o poca resistencia mecánica no son adecuados para ser usados como fase estacionaria en columnas cromatográficas, de hecho no existe ningún reporte previo donde se hayan sintetizado microesferas estampadas molecularmente con glucosa o fructosa, lo cual hace de este trabajo algo novedoso.

Los materiales descritos aquí tienen una aplicación potencial como fase estacionaria para la separación de glucosa y fructosa en mezclas de ambos azúcares.



### RECOMENDACIONES

Falta mucho por hacer y entender, ya que la síntesis de un polímero estampado molecularmente depende de muchos factores que están relacionados entre sí, sin embargo este trabajo es un buen precedente para futuros trabajos en el área del estampado molecular. En este caso es necesario aumentar la capacidad de carga y selectividad de los polímeros. Una vía sería buscar la relación óptima de entrecruzante que nos permitiera tener un polímero más poroso con cavidades de tamaño y forma más homogéneos y así aumentar la capacidad de carga, como se sabe la selectividad depende de la posición de los grupos funcionales dentro de la cavidad, esto podría lograrse por medio de un monómero funcional que tenga una constante de asociación más fuerte que la acrilamida con los grupos -OH de la glucosa en medio acuoso o la selección de un solvente que estabilice mejor el complejo monómero funcional-plantilla, de hecho, podrían utilizarse los reactivos empleados en reportes previos, los cuales mostraron tener una mayor capacidad de enlace y selectividad en medio acuoso junto con el método de polimerización presentado en este trabajo, para la obtención de microesferas estampadas molecularmente. Este tipo de polímeros tendrían un campo de aplicación muy importante dentro de la industria de los jarabes de alta fructosa (en la separación de una mezcla de glucosa / fructosa) o también en la industria farmacéutica como sensores para el control de la glucosa o en análisis clínicos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Centro de Estudios de las Finanzas Públicas, El impacto de las importaciones de fructosa en la industria azucarera, Palacio Legislativo de San Lázaro, Julio 2005.
- 2) Bustamente, R. Rincón, Estudios de las variables que afectan la producción por medio enzimáticos de jarabes de alta fructosa, Universidad Industrial de Santander (1990) 102.
- 3) A. Creus, A. Casasús, J. García, A. Sánchez, Área temática 3: Ingeniería de productos y de procesos, Ponencia: Planta piloto del laboratorio de fructosa, Universitat Politècnica de Catalunya 1-6.
- 4) C. Montes, I. Magaña, Enzimas con aplicación industrial, Avance y Perspectiva vol. 21 (2002) 279-282.
- 5) P.A.G. Cormack, A. Zurutuza, Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterization, J. Chrom. B (2004) article in press.
- 6) J.M. Lin, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Hobo, Capillary electrochromatographic separation of amino acid enantiomers using on-column prepared molecularly imprinted polymer, J. Pharm. and Biomed. Anal. 15 (1997) 1351-1358.
- 7) L. Ye, K. Mosbach, The technique of molecular imprinting – Principle, state of the art, and future aspects, J. Incl. Phen. and Macrocyc. Chem. 41 (2001) 107–113.
- 8) M. Blader, Molecular imprinting, Molec. Biol. and Biotech. Ed Spring (1994) 9-14.
- 9) P.A.G. Cormack, K. Mosbach, Molecular imprinting: Recent developments and the road ahead, React. & Funct. Polym. 41 (1999) 115–124.
- 10) O. Ramström, Molecular imprinting technology, Pure and Applied Biochemistry, (1996) 1-10.
- 11) L. Ye, K. Mosbach, The development of artificial antibodies by molecular imprinting, Pure and Applied Biochemistry, (1996) 162-172.
- 12) W.J. Wizeman, P. Kofinas, Molecularly imprinted polymer hydrogels displaying isomerically resolved glucose binding, Biomat. 22 (2001) 1485-1491.

- 13) D. Batra, K.J. Shea, Combinatorial methods in molecular imprinting, *Curr. Op. in Chem. Biol.* 7 (2003) 434–442.
- 14) T. Zhang, F. Liu, W. Chen, J. Wang, K. Li, Influence of intramolecular hydrogen bond of templates on molecular recognition of molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta* 450 (2001) 53-61.
- 15) A. Rachkov, N. Minoura, Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach, *Biochim. Biophys. Acta* 1544 (2001) 255-266.
- 16) H. Shi, B.D. Ratner, Template recognition of protein-imprinted polymer surfaces, 25<sup>th</sup> Annual Meet. of the Soc. for Biomat., 1999.
- 17) H.S. Andersson, J.G. Karlsson, S. Piletsky, A. Christin, K. Schmidt, K. Mosbach, I. Nicholls, Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers: Influence of monomer-template ratio and sample load on retention and selectivity. *J. of Chromat. A*, 848 (1999) 39-49.
- 18) I.A. Nicholls, K. Adbo, H.S. Andersson, P.O. Andersson, J. Ankarloo, J. Dahlström, P. Jokela, J. Karlsson, L. Olofsson, J. Rosengren, S. Shoravi, J. Svenson, S. Wikman, Can we rationally design molecularly imprinted polymers?, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 9-18.
- 19) G. Wulff, K. Knorr, Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting, *Bioseparation 10: Ed. Acad. Publis.* (2002) 257-276
- 20) S. Vidyasankar, M. Ru, F.H. Arnold, Molecularly imprinted ligand-exchange adsorbents for the chiral separation of underivatized amino acids. *J. Chromat. A* 775 (1997) 51-63.
- 21) K. Sreenivasan, The use of metal-containing monomer in the preparation of molecularly imprinted polymer to increase the adsorption capacity, *Biomed. Tech. Wing.* (1999) 2795-2799.
- 22) A. Martín, Molecularly imprinted polymers: New molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds, *J Anal Chem.* 370 (2001) 795-802.
- 23) Y. Chen, M. Kele, I. Quiñones, B. Sellergren, G. Guiochon, Influence of the pH on the behavior of an imprinted polymeric stationary phase-supporting evidence for a binding site model, *J. Chromat. A* 927 (2001) 1-17.
- 24) W. Chen, C. Chen, F. Lin, Molecular recognition in imprinted polymers: Thermodynamic investigation of analyte binding using microcalorimetry, *J. Chromat. A* 923 (2001) 1-6.

- 25)** T. Pap, V. Horváth, A. Tolokán, G. Horvai, B. Sellergren, Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction, *J. Chromat. A* 973 (2002) 1-12.
- 26)** R.J. Ansell, MIP-ligand binding assays (pseudo-immunoassays). *Bioseparation 10*: Ed. Acad. Publis. (2002) 365–377.
- 27)** M. E. Byrne, E. Oral, J. Z. Hilt, N. A. Peppas, Networks for recognition of biomolecules: Molecular imprinting and micropatterning poly(ethylene glycol)-containing films, *Polym. Advant. Tech.* 13 (2002) 798-816.
- 28)** L.I. Andersson, Selective solid-phase extraction of bio- and environmental samples using molecularly imprinted polymers, *Bioseparation 10*: Ed. Acad. Publis. (2002) 353–364.
- 29)** R.J. Ansell, K. Mosbach, Molecularly imprinted polymers by suspension polymerisation in perfluorocarbon liquids, with emphasis on the influence of the porogenic solvent, *J. Chromat. A* 787 (1997) 55-66.
- 30)** L. Ye, K. Mosbach, Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics, *Reac. Func. Polym.* 48 (2001) 149-157.
- 31)** L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, Molecular imprinting on microgel spheres, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 187-196.
- 32)** N. Pérez, A.G. Mayes, Novel MIP formats, *Bioseparation 10*: Ed. Acad. Publis. (2002) 287–299.
- 33)** P. Spégel, L. Schweitz, S. Nilsson, Molecularly imprinted microparticles for capillary electrochromatography: studies on microparticle synthesis and electrolyte composition, *Electrophoresis* 22 (2001) 3833-3841.
- 34)** N. Pérez, A.G. Mayes, Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerization methods, *Anal. Chim. Acta* (2003) article in press.
- 35)** N. Cameron, Synthesis, functionalization and characterization of porous polymer supports, SMASHYBIO Training Course, March 13-14, 2003.
- 36)** N. A. Peppas, Y. Huang, Polymer and Gels as Molecular Recognition Agents, *Pharm. Research*, vol. 19, 5 (2002) 578-587.
- 37)** M.F. Chaplin, *Carbohydrates analysis: a practical approach*, Oxford University Press, 1994.

- 38) A.A. García, M.R. Bonen, J. Ramírez, M. Sadaka, A. Vuppu, *Bioseparation Process Science*, Blackwell Science, Inc. 1999.
- 39) T. Takeuchi, J. Haginaka, Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers, *J. Chromat. B* 728 (1999) 1-20.
- 40) J. Haginaka, HPLC-based bioseparations using molecularly imprinted polymers, *Bioseparation 10: Ed. Acad. Publis.* (2002) 337–351.
- 41) S. Striegler, Investigation of disaccharide recognition by molecularly imprinted polymers, *Bioseparation 10* (2002) 307-314.
- 42) R. Kirchner, J. Seidel, Gertwolf, G. Wulff, Calorimetric investigation of chiral recognition processes in a molecularly imprinted polymer, *J. Incl. Phenom. and Macrocyc. Chem.* 43 (2002) 279–283.
- 43) S. Gao, W. Wang, B. Wang, Building fluorescent sensors for carbohydrates using template-directed polymerizations, **Bioorg. Chem.** 29 (2001) 308-320.
- 44) Lecture 10: Bioengineering applications of hydrogels: Molecular imprinting and drug delivery, *Molec. Princ. of Biomat.* Ed. Spring (2003).
- 45) McMurry, *Química Orgánica*. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. de C.V. 1994.
- 46) Jorge Godinez, Tesis: Obtención y caracterización de copolímeros de N-fenilmaleimida, Facultad de Química UNAM (2002).
- 47) Alberto López, Tesis: Vulcanización dinámica de mezclas poliméricas de EPDM-polipropileno, Facultad de Química UNAM (2002).
- 48) K. Haupt, K. Mosbach, *Plastic antibodies: developments and applications*, TIBTECH vol. 16 (1998) 468-475.
- 49) J. Svenson, I.A. Nicholls, On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 19-24.
- 50) S.A. Piletsky, S. Alcock, A.P.F. Turner, Molecular imprinting: At the edge of the third millennium, *Trend in Biotech.* Vol. 19 No.1 (2001) 9-12.
- 51) P.K. Owens, L. Karlsson, E.S.M. Lutz, L.I. Andersson, Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis, *Trends in Anal. Chem.* Vol. 18 no. 3 (1999) 146-154.

- 52) L. I. Anderson, Molecular Imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *J. of Chromat. B* 145 (2000) 3-13.
- 53) O. Brüggenmann, Chemical reaction engineering using molecularly imprinted polymeric catalysts, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 197-207.
- 54) C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes, Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis, *Tetrahedron* 59 (2003) 2025-2057.
- 55) M. Tada, Y. Iwasawa, Designing molecular imprinting-imprinting metal-complex catalysis, *J. of Molec. Catal. A: Chem.* 199 (2003) 115-137.
- 56) K. Yano, I. Karube, Molecular imprinted polymers for biosensor applications, *Trends in Anal. Chem. Vol. 18 no.3* (1999) 199-204 .
- 57) A. G. Mayes, K. Mosbach, Molecular imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?, *Trends in Anal. Chem. Vol. 16 no.6* (1997) 321-332.
- 58) F.L. Dickert, O. Hayden. Molecular imprinting in chemical sensing, *Trends in Anal. Chem. Vol. 18 no.3* (1999) 192-199.
- 59) P. Bures, Y. Huang, E. Oral, N. A. Peppas, Surface modifications and molecular imprinting of polymer in medical and pharmaceutical application, *J. of Cont. Rel.* 72 (2001) 25-33.
- 60) M. Ulbricht, M. Belter, U. Langenhangen, F. Schneider, W. Weigel, Novel molecularly imprinted polymer (MIP) composite membranes via controlled surface and pore functionalizations, *Desalination* 149 (2002) 293-295.
- 61) Martha Roa, Tesis: Estudio experimental de entrecruzamiento térmico de polibutadienos, Facultad de Química UNAM (2003).
- 62) J.C.P. Chen, Manual del azúcar de caña, Ed. Noriega-Limusa (1999) 49-50.
- 63) J. Brandrup, E. H. Immergut and E. A. Grulke, *Polymer Handbook*, John Wiley & Sons, Inc. 1999.