



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

DIPLOMADO EN QUÍMICA LEGAL

**Polímeros Molecularmente Impresos: Una  
Alternativa en la Preparación de Muestras  
Forenses para  
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

VALENCIA MANUEL JORGE

Asesor: Q. Carlos Salvador Valadez Sánchez

Marzo de 2008

México D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

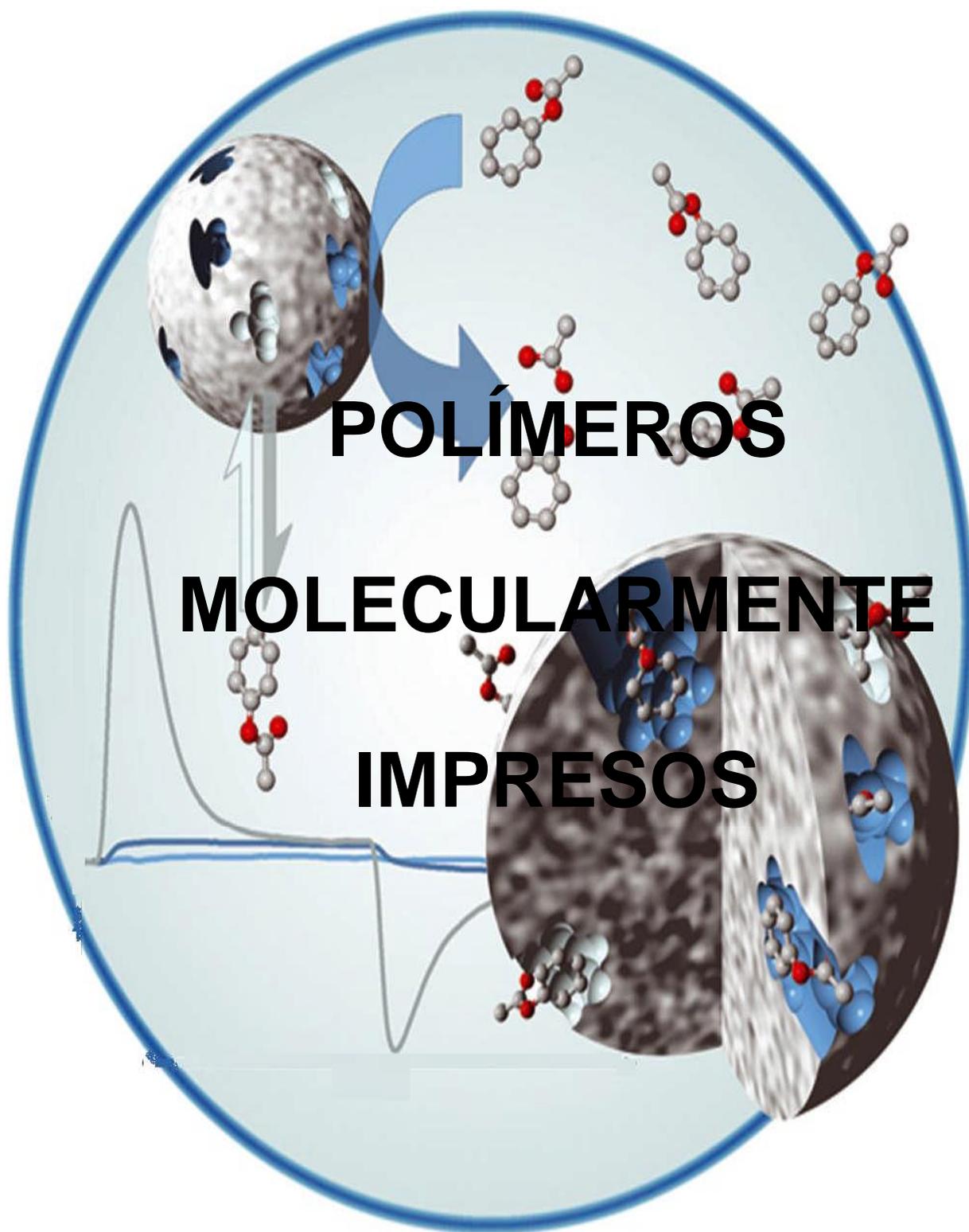


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.



# *A G R A D E C I M I E N T O S*

*A DIOS*

*Por darme la oportunidad de vivir y tener una vida completa y plena.*

*A MIS PADRES: TERESA Y ANTONIO*

*Que con su comprensión, cariño, confianza y apoyo incondicional supieron brindarme la oportunidad de lo que hoy es una realidad. Ustedes son parte de este logro.*

*Los amo!*

*A LA UNAM*

*Por ser la casa mater que me dio la oportunidad de emprender un proyecto que aun continúa.*

*Por brindarme el conocimiento científico y cultural que me han permitido enriquecer mi persona y con ello tener la confianza y certeza de ser un profesional comprometido con mi país.*

*A MIS HERMANOS: LAURA Y MARCO ANTONIO*

*Por apoyarme en todo momento en esta dura etapa.  
Thanks!*

*A MIS JEFESAURIOS: ANA MARÍA Y BENJAMÍN*

*Por ser mi segunda familia y brindarme todo su apoyo.*

*A MIS AMIGOS*

*Por haber tenido el privilegio de conocerlos y aprender de ustedes*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno VALENCIA MANUEL JORGE, con número de cuenta 40109109-2 de la carrera de Q. F. B., se le ha fijado el día 31 del mes de marzo de 2008 a las 15:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE M. en C. MA. PATRICIA SHIRLEY DEMARE NEGRETE
VOCAL Q. CARLOS SALVADOR VALADEZ SÁNCHEZ
SECRETARIO DR. ADELFO N. REYES RAMÍREZ
SUPLENTE Q.F.B. MA. DEL ROSARIO BENÍTEZ VELÁZQUEZ
SUPLENTE Q.F.B. ALICIA CABRERA AGUILAR

Handwritten signatures of the jury members on horizontal lines.

El título de la tesis que se presenta es: Polímeros Molecularmente Impresos: Una Alternativa en la Preparación de Muestras Forenses para Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Opción de titulación: Paquete de Educación Continua

ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU" México, D.F. a, 06 de marzo de 2008.

C. D. ALFREDO SALVADOR SANCHEZ FIGUEROA

DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA DIRECCION

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.



## INDICE

1. RESUMEN .....	3
2. INTRODUCCIÓN .....	4
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo General.....	6
3.2. Objetivos Particulares.....	6
4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	7
5. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO .....	8
6. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO .....	8
7. TIPO DE ESTUDIO .....	8
8.0. MARCO TEÓRICO .....	9
8.1. TOXICOLOGÍA FORENSE .....	9
8.2. ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO .....	11
8.3 ORIGEN DE LOS POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS (PMIs)..	16
8.4 IMPRESIÓN MOLECULAR .....	17
8.4.1 Definición .....	20
8.5. FUNDAMENTOS DE LA IMPRESIÓN MOLECULAR .....	21
8.5.1. Principio General de la Impresión Molecular .....	21
8.6. POLIMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS (PMIs).....	23
8.6.1. Definición .....	23
8.6.2. Historia .....	23
8.6.3. Características.....	25
8.6.4. Ventajas y Desventajas.....	26
8.6.4.1. Ventajas de los PMIs .....	26
8.6.4.2. Desventajas de los PMIs.....	26
8.7. IMPRESIÓN COVALENTE E IMPRESIÓN NO COVALENTE .....	27
8.7.1. Impresión Covalente .....	27
8.7.2. Impresión No Covalente .....	28
8.7.3. Impresión semicovalente.....	29
8.8. POLIMERIZACIÓN .....	30
8.8.1. Métodos de polimerización .....	30
8.8.1.1. Polimerización por radicales libres .....	30
8.8.1.2. Copolimerización por radicales libres.....	32
8.8.1.3. Polímeros reticulados .....	35
8.8.1.4. Polímeros tipo gel, macroporos y microgeles.....	37
8.9. SINTESIS DE PMIs.....	40
8.9.1. Componentes .....	40
8.9.2. Síntesis.....	40
8.9.2.1. Plantilla o Molécula Molde.....	41
8.9.2.2. Monómeros Funcionales .....	41
8.9.2.3. Reticuladores o Ligantes.....	44
8.9.2.4. Disolventes o porógenos.....	46
8.9.2.5 Iniciadores .....	47



---

<b>8.10. PROCEDIMIENTO GENERAL DE POLIMERIZACIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>8.11. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO .....</b>	<b>59</b>
8.11.1. La Caracterización Morfológica .....	59
8.11.2. La Caracterización Química .....	61
<b>8.12. APLICACIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>8.13. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS) .....</b>	<b>66</b>
<b>8.14. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS (PMIEFS).....</b>	<b>68</b>
8.14.1. Aplicación y Retención de la muestra .....	69
8.14.2. Lavado .....	71
8.14.3. Elución .....	71
8.14.4. Formas de Aplicación .....	72
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>74</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>11. ABREVIATURAS.....</b>	<b>76</b>
<b>12. GLOSARIO .....</b>	<b>77</b>
<b>13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>



---

## 1. RESUMEN

El siguiente trabajo presenta la utilidad de la técnica de impresión molecular como una alternativa en la preparación de muestras forenses para la determinación de drogas de abuso en muestras biológicas por medio del uso de **Polímeros Molecularmente Impresos (PMIs, ó MIPs**, por sus siglas en inglés). De igual manera, se dan a conocer las ventajas que ofrece esta técnica, los métodos de síntesis de los Polímeros Molecularmente Impresos, consideraciones y características que deben reunir, métodos para su caracterización así como su aplicación en diferentes áreas entre las que se considera a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), aplicada a la química forense.



---

## 2. INTRODUCCIÓN

El consumo de diversos tipos de drogas ha sido una constante observada desde la antigüedad en numerosos pueblos y culturas. Pero el fenómeno de drogadicción ha alcanzado una extraordinaria importancia, por su difusión, consecuencias sociales y sanitarias, en las últimas décadas.<sup>1</sup>

El fenómeno de drogadicción es muy complejo; en él se mezclan dimensiones puramente médicas junto con otras de tipo sociológico, cultural, antropológico, ideológico, de política mundial, entre otras. Este fenómeno se considera desde los años setenta como una auténtica epidemia y uno de los más graves problemas socio-sanitarios, debido al costo que representa en términos de vidas, descenso de la productividad laboral, conflictos familiares y delitos contra la sociedad.<sup>1</sup>

El uso de drogas de abuso se ha incrementado dramáticamente en las últimas tres décadas.<sup>2</sup> La técnica mas empleada en el pre-tratamiento de drogas de abuso es la extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida. Aunque ésta última ofrece la posibilidad de identificar varios compuestos de manera simultánea, el problema se presenta en la técnica de detección de los métodos analíticos empleados tales como la Cromatografía de Gases, ya que el equipo resulta demasiado costoso. Además, la etapa de derivatización se dificulta con algunos compuestos. Otros métodos analíticos empleados son el inmunoensayo, cromatografía en capa fina, espectroscopia de Raman, espectroscopia de fluorescencia y cromatografía líquida acoplada a detectores electroquímicos.<sup>3</sup>



---

Actualmente, las drogas de abuso han llegado a ser un problema serio, no sólo en México sino a nivel mundial. De tal forma que se requiere del desarrollo de métodos analíticos simples y convenientes para su análisis y poder así prevenir y proteger riesgos en la salud humana. Así, se han desarrollado diversos métodos de identificación y cuantificación para drogas de abuso. Entre las más utilizadas están: 1) la cromatografía de gases acoplado a masas, 2) la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a masas. En el caso de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) se han desarrollado métodos alternativos como el uso pre-columnas y post-columnas para sensibilizar el método.

A pesar de que se cuenta con una variedad de métodos analíticos para la identificación de drogas de abuso, aun se requiere del desarrollo de dispositivos portátiles multisensoriales los cuales permiten un análisis rápido y efectivo de un amplio rango de compuestos de abuso. Entre los requerimientos para la identificación de drogas están la simplicidad para la recolección de la muestra, la preparación de la muestra de manera rápida y fácil, bajo costo y un incremento en la velocidad de la prueba.<sup>4</sup>

El siguiente trabajo presenta la utilidad de la técnica de impresión molecular la cual se basa en la utilización de Polímeros Molecularmente Impresos (PMIs), como un nuevo empaque para la Extracción en Fase Sólida en el pre-tratamiento de las muestras forenses.



---

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo General

Describir el uso y aplicaciones de los Polímeros Molecularmente Impresos como una alternativa en la preparación de muestras para la determinación de drogas de abuso para Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

### 3.2. Objetivos Particulares

1. Describir las ventajas que ofrece la técnica de Impresión Molecular en la preparación de muestras forenses.
2. Describir las ventajas y desventajas de los PMIs.
3. Describir la síntesis de PMIs.
4. Describir los campos de aplicación de la Tecnología de Impresión Molecular.



---

## 4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En las técnicas cromatográficas tanto de gases como de líquidos de alta resolución, el pre-tratamiento de la muestra es un paso esencial precedente a la identificación de compuestos. La cromatografía de gases (CG) es, por excelencia, el método convencional utilizado en los campos de la toxicología y forense debido a la sensibilidad y selectividad que ofrece, sin embargo, se requiere de un proceso de derivatización (bajo condiciones anhidras) de los compuestos de interés (analitos) para volatilizarlos y poder analizarlos. Esto es una limitante para los compuestos hidrosolubles ya que se hace más difícil el proceso de derivatización. En el caso específico de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), se presenta como una técnica muy versátil y no requiere de derivatización.

Ahora bien, el pre-tratamiento de las muestras forenses es un paso clave previo a su análisis por lo que se emplean procesos de fraccionamiento, extracción o pre-separación. Uno de estos procesos es la Extracción en Fase Sólida (EFS), una técnica muy empleada en la actualidad en muchos campos entre los cuales se encuentra el forense. Así, la adaptación de un proceso de EFS a la CLAR hace de ella una herramienta más eficiente en la determinación de drogas de abuso. Sin embargo, se requieren de nuevos materiales de adsorción para la EFS que permitan mayor selectividad y sensibilidad en el proceso y con ello beneficiar no sólo al ámbito forense ni a las ciencias analíticas sino directamente a la protección de la salud.

Ante este panorama, se realizó una investigación enfocada al empleo de Polímeros Molecularmente Impresos como nuevos materiales de empaque para la Extracción en Fase Sólida.



---

## **5. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO**

La presente investigación permite establecer los fundamentos de una técnica relativamente novedosa como una alternativa en la obtención de nuevos materiales de empaque para la Extracción en Fase Sólida y con ello obtener un proceso más selectivo y eficiente en el pre-tratamiento de las muestras forenses previo al análisis de las drogas de abuso, o bien, compuestos que requieran de separación, aislamiento, identificación y cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Hoy en día, la importancia relevante de esta técnica analítica resulta imprescindible para su aplicación en diferentes áreas de la química y ciencias forenses así como de la salud. Por consiguiente, es necesario el desarrollo de nuevos métodos de preparación de muestras que permitan obtener un análisis más eficiente y con ello brindar una mayor confianza en los resultados obtenidos que, en un momento dado pueden resultar determinantes para ciertos casos como el que nos ocupa, que es el de las ciencias químico-forenses.

## **6. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO**

La investigación abarca los últimos tres lustros, es decir, de los años 90's a la fecha, enfocada únicamente a los fundamentos de la impresión molecular y el uso de PMIs en la preparación de muestras forenses para la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

## **7. TIPO DE ESTUDIO**

Tesina monográfica, descriptiva, retrospectiva y longitudinal.



## 8. MARCO TEÓRICO

### 8.1. TOXICOLOGÍA FORENSE

El papel de la toxicología forense es básicamente detectar e identificar la presencia de drogas y venenos en fluidos biológicos, tejidos y órganos. El aumento del uso y abuso implica que la mayoría de las sustancias tóxicas sean drogas, así que el analista ha ideado una manera de extraerlas, al igual que sus metabolitos para identificarlos, y si es necesario cuantificarlos.

Cuando se desconoce la cantidad y tipo de drogas en la muestra, se emplea el inmunoensayo como prueba presuntiva. Generalmente, las muestras que contienen opiáceos, *cannabis*, amfetaminas, cocaína, metadona y benzodiazepinas son las que se analizan de manera rutinaria. Los resultados positivos en las pruebas presuntivas proporcionan al analista una lista de drogas con las cuales se confronta para que tales drogas sean confirmadas y posteriormente cuantificadas.

Las drogas se clasifican ampliamente como ácidas (por ejemplo los barbitúricos), básicos (como las amfetaminas, cocaína y metadona), y neutros o anfótericos (por ejemplo la morfina y los opiáceos). Éstas y sus principales metabolitos se extraen de fluidos biológicos controlando el pH de la solución donde se encuentran. La extracción en fase sólida (EFS) es actualmente la más utilizada respecto a la extracción líquido-líquido, principalmente debido a que es susceptible de automatizarse.<sup>5</sup>



---

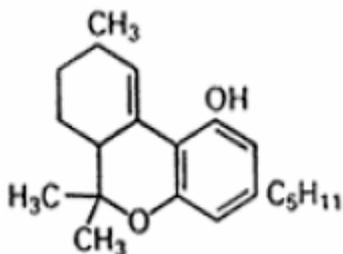
Los cartuchos de EFS se pueden utilizar en trabajos pequeños hasta para procesos automatizados a gran escala. Después de la extracción y purificación, la presencia de droga(s) se confirma mediante técnicas espectroscópicas, cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) o cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (CL-EM). La confirmación por cualquiera de estos métodos es esencial porque la técnica presuntiva puede no ser lo suficientemente específica. Los protocolos técnicos son altamente específicos y permiten la cuantificación en los niveles de sensibilidad requeridos. Los métodos de CG-EM generalmente requieren derivatización de los extractos para volatilizarlos contrario a los métodos de CL-EM. Ésta última, es particularmente útil en casos donde los analitos son termolábiles.<sup>5</sup>



## 8.2. ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO

Los principales tipos de drogas de abuso que se pueden encontrar de manera común en un análisis de drogas son: *Cannabis*, amfetaminas, cocaína, heroína.

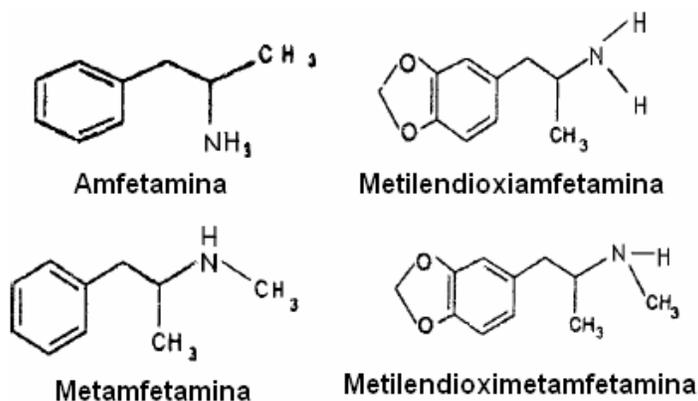
**Las Muestras de *Cannabis*** se pueden presentar en tres formas para su análisis: en forma de hoja, resina, o aceite. El principal responsable de su actividad es el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (figura 1). Las pruebas presuntivas para su detección son la cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos de las hojas, resinas o aceite de la planta. Las pruebas confirmativas de los derivados trimetilsililos de los principales componentes como el  $\Delta^9$ -THC, cannabidiol, cannabinol y en menor grado en el  $\Delta^8$ -THC y el ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico son la CG-EM, la técnica identifica, inequívocamente, los compuestos derivados. La CLAR y la CG-EM se pueden utilizar para tales propósitos. La prueba preliminar de CCF es un buen indicador de si una cierta cantidad de resina es o no de un mismo lote, lo cual es confirmado por CLAR en fase reversa. La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es particularmente útil en casos donde la muestra no requiera derivatización a comparación de la CG-EM. Los ácidos tetrahidrocannabinólicos son termolábiles y pueden descomponerse bajo condiciones de la CG-EM.<sup>5</sup>



**FIGURA 1.** Estructura química del  $\Delta$ -9THC.



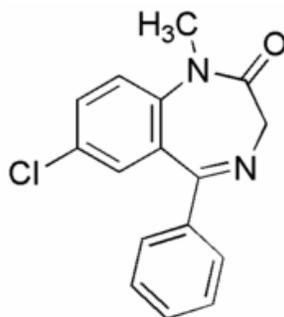
**El Grupo de las Amfetaminas**, denominadas Drogas de Diseño, incluye a la amfetamina, metilamfetamina, 3,4-metilendioxi amfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi metilamfetamina (MDMA o éxtasis) y 3,4-metilendioxi etilamfetamina (MDEA) (figura 2). Estas drogas usualmente son sintéticas, se comercializan como polvos y son adulteradas o diluidas con una gran variedad de compuestos que incluyen glucosa monohidratada, manitol, sales (como el  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), cafeína y almidón. Generalmente, se ingieren oralmente en forma de polvo o tableta. La prueba de Marquis es una prueba presuntiva para detectar amfetaminas y otras drogas, dependiendo del color de la reacción. En presencia de amfetamina y metilamfetamina se genera un color amarillo-naranja. Con amfetaminas sustituidas en un anillo dan una coloración azul-púrpura. La confirmación de este tipo de drogas es por CG-EM con una apropiada derivatización. La RMN o la CLAR se utilizan para cuantificarlas.<sup>5</sup>



**Figura 2.** Estructuras químicas del grupo de las amfetaminas.



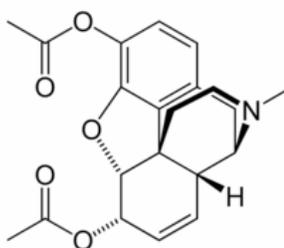
**Las Benzodiazepinas** (figura 3) aunque no se consideran un tipo de droga de abuso son fármacos que se presentan en forma farmacéutica y se comercializan como medicamentos farmacéuticos controlados. Estas, pueden en un momento dado producir dependencia al igual que la heroína, cocaína, cannabis y amfetaminas las cuales se comercializan en el mercado negro a diferencia de las primeras. Usualmente se encuentran como tabletas o cápsulas que contienen cantidades controladas de droga. Si las pruebas presuntivas dan positivas a benzodiazepinas, se continúa con un análisis por cromatografía en capa fina.<sup>5</sup>



**Figura 3.** Estructura química base de las benzodiazepinas representada por el Diazepam.

Las benzodiazepinas no requieren proceso de derivatización y se analizan puramente por CG-EM. Si se relacionan los tiempos de retención y la información obtenida del espectro, entonces se puede confirmar la identificación. La cuantificación se realiza convenientemente por CLAR con detección UV.

**La Heroína, o Diamorfina** (diacetilmorfina) (figura 4), se produce por acetilación de la morfina la cual es aislada de la goma de opio. El olor avinagrado característico de los polvos que contienen heroína es debido a la hidrólisis con la subsecuente formación de monoacetilmorfina, morfina y ácido acético. La pureza de la droga que se comercializa puede variar, la más común es la que contiene 35% de diamorfina. La forma más común de heroína es la sal (el clorhidrato), que es soluble en agua, y la base la cual es insoluble en agua. La sal es por lo tanto la forma común para administrarse vía intravenosa. De la misma forma, la base es inhalada o fumada.<sup>5</sup>



**Figura 4.** Estructura química de la Heroína.

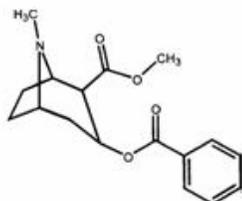
La droga común comprende, ya sea la sal o la base, mezclada o “cortada” con varias sustancias como fenobarbitona, paracetamol, cafeína, procaína, lignocaína, codeína, fenolftaleína, calcita y lactosa monohidratada. La heroína como tal, usualmente, consiste en una mezcla de 6-monoacetilmorfina, morfina y codeína, así que la mayoría de las muestras de heroína son bastante complejas si se adulteran con alguna de las sustancias mencionadas. La prueba presuntiva para heroína es la prueba de Marquis en la cual el opiáceo reacciona para dar un color violeta-azul. La CCF con un eluyente adecuado revela la mayoría de los componentes de la mezcla, de igual manera la CG-EM es el método confirmativo de identificación para la heroína.

La cuantificación de heroína se puede realizar por CG o por CLAR. La CG requiere de derivatización de las muestras pero la CLAR requiere únicamente de muestras que sean solubles.

La CCF podría ser suficiente como una prueba principal de comparación, y ésta es más efectiva para un gran número de muestras en las que se podría fácilmente identificarlas de aquellas que son diferentes, pero esto no es cuantitativo. La CLAR es cuantitativa pero no proporciona un análisis definitivo en cuanto a la identificación de cada pico cromatográfico. La comparación de las muestras requiere exactamente el mismo tratamiento para cada una de ellas, y si como resultado, los cromatogramas y el espectro de masas son indistinguibles, se considera que las muestras provienen de la misma fuente.



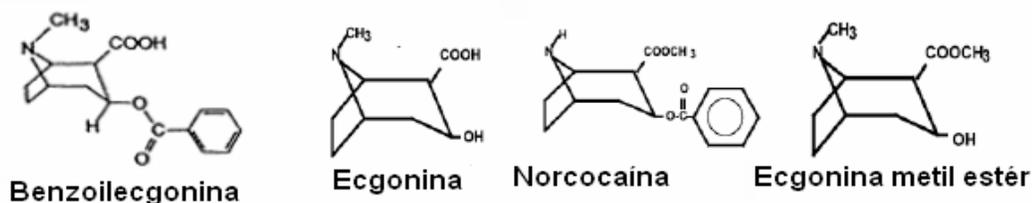
**La Cocaína** (figura 5) se extrae de las hojas de coca. Una forma de cocaína que ha ganado amplia popularidad es el *crack*. Este es la forma en base libre de la cocaína y se prepara a partir del clorhidrato de cocaína por mezcla de la sal con bicarbonato de sodio, agua, y calentamiento. El crack se fuma o se inhala. La sal (el clorhidrato de cocaína) es un polvo blanco conocido como *snow*. Ambos, el clorhidrato y la base, se venden en las calles como polvo cortado con varios adulterantes como manitol, glucosa monohidratada, lignocaína, procaína base y clorhidrato. Las pruebas presuntivas para cocaína incluyen la prueba con isocianato de cobalto, la cual no identifica específicamente cocaína. Esta prueba, y una versión modificada, llamada prueba de Scott, la cual es más específica, ambas se basan en una reacción colorimétrica.



**Figura 5.** Estructura química de la Cocaína.

La CCF se realiza en soluciones metanólicas para muestras decomisadas, y puede identificarse si la cocaína se relaciona con compuestos tales como lignocaína y procaína. La CG-EM es la técnica utilizada como prueba confirmativa y también para cuantificar.<sup>5</sup>

La cocaína a diferencia de la heroína, se produce en lotes con impurezas, y el nivel de estas, puede variar. Como resultado, las muestras de diferentes lotes pueden variar en composición a nivel de trazas. El perfil de la cocaína incluye cocaína, ecgonina, benzoilecgonina, norcocaína y ecgonina metil ester (figura6).<sup>5</sup>



**Figura 6.** Metabolitos de la cocaína en un perfil analítico



---

### 8.3. ORIGEN DE LOS POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS (PMIs)

El reconocimiento molecular es un requerimiento fundamental en los sistemas vivientes, a través de millones de años y de una serie innumerable de cambios evolutivos óptimos, la biología ha llegado a ser una maestra de este arte. A nivel celular y subcelular los procesos fundamentales de la vida, la transferencia de información y reacciones catalíticas, dependen de interacciones específicas de moléculas de bajo peso molecular con “huéspedes” macromoleculares. En la mayoría de estos casos la macromolécula es una proteína. Los procesos diversos tales como transmisión neuronal, respiración, defensa inmune, diferenciación celular y nutrición, todos dependen del principio de reconocimiento molecular específico. Por lo tanto no es de sorprenderse que los científicos estén interesados enormemente en aprovechar el alto potencial del reconocimiento molecular biológico, anticuerpos, enzimas y más recientemente en tratar de imitar estas propiedades desarrollando materiales sintéticos que permitan cumplir con tales funciones. Así, se han desarrollado varias propuestas sintéticas que han intentado imitar el reconocimiento molecular dinámico no covalente para sacar provecho de la biología. Inherentemente, las propuestas apuntan a resolver el problema por la misma vía, creando una cavidad o estructura enlazante en la cual los grupos funcionales se puedan posicionar para que se vean favorecidas las interacciones no covalentes recíprocas entre el sitio de enlace y el analito específico de entrada. Una de las propuestas más prometedoras es la **Impresión Molecular**.<sup>6</sup>

### 8.4. IMPRESIÓN MOLECULAR

La idea la Impresión Molecular fue inspirada por la teoría de Pauling sobre la formación anticuerpos en el sistema inmune. Pauling teorizaba que los anticuerpos se desnaturalizaban al igual que las proteínas, rompiendo los enlaces de hidrógeno y liberando las cadenas de aminoácidos para moverse libremente.



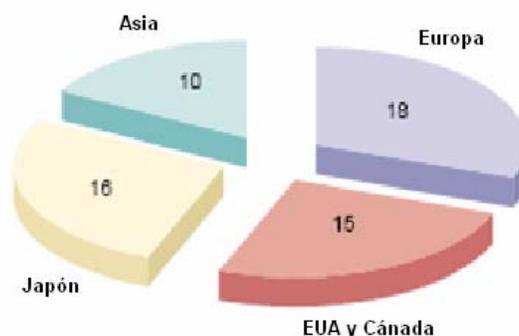
Cuando entraban en contacto con un antígeno, las propiedades químicas de éste podrían atraer a los aminoácidos del anticuerpo. De esta manera, el anticuerpo podía memorizar la forma del antígeno. El proceso se denominó Mecanismo Molecular Complementario. La hipótesis fue refutada más tarde pero la idea del movimiento las cadenas libres del compuesto que, en un momento dado pueden formar un molde complementario alrededor de la estructura, inspiró el surgimiento de los Polímeros Molecularmente Impresos.<sup>7</sup>

La tecnología de impresión molecular tiene como objetivo la creación de polímeros capaces de reconocer de manera específica una molécula, mimetizando el comportamiento de los anticuerpos y otros receptores naturales. A pesar de que es, relativamente, de reciente aplicación tiene sus orígenes en la década de los 70s con el Dr. Wulff,<sup>8</sup> quien propone la “teoría covalente” para explicar el proceso de impresión molecular. A partir de ahí se generaron distintos grupos de investigación sobre el tema, pero fue hasta principios de los 80s cuando surge un realce en el tema con el Dr. Mosbach<sup>9</sup> proponiendo la “teoría no covalente”; es él y su grupo de trabajo quienes introducen el concepto de “Impresión Molecular” en 1981. En los últimos 10 años ha surgido un interés especial entre la comunidad académica y grupos de investigación industrial a nivel mundial. Como dato, alrededor de 500 artículos se han reportado en la literatura y un buen número de patentes se han registrado.

Actualmente, la distribución geográfica de la actividad de investigación relacionada a los PMIs es diferente a muchas otras áreas técnicas. Japón y EUA se mantienen entre los líderes en el área casi a la par con Europa. Este último juega un papel importante en la investigación de los PMIs y contribuye mayormente en el desarrollo de esta tecnología, a pesar de que la mayoría las



compañías que se encuentran involucradas en el área se ubican en EUA (figura7).<sup>10</sup>



**Figura 7.** Distribución actual de la investigación sobre PMIs.

Las aplicaciones de la impresión molecular se han extendido ampliamente y los polímeros sintetizados se han empleado principalmente como: materiales de empaque para procesos de separación, bioimitadores de anticuerpos para el reconocimiento e identificación de antígenos, imitadores de enzimas para aplicaciones catalíticas y como biosensores en el reconocimiento de elementos. Una de las áreas más estudiadas y de mayor aplicación ha sido el área de las separaciones. La impresión molecular se presenta como una técnica simple con una selectividad predeterminada para el pre tratamiento de muestras que requieran separación. Se han empleado en separaciones de mezclas racémicas de aminoácidos, anestésicos locales, inmunosupresores, opiáceos, esteroides, entre otros compuestos. Se ha puesto especial énfasis en la separación de sustancias farmacéuticas, por ejemplo, naproxeno (un antiinflamatorio no esteroideo),<sup>11</sup> timolol (bloqueador  $\beta$ -adrenérgico),<sup>12</sup> efedrina (agonista adrenérgico), benzodiacepinas (diazepam),<sup>13</sup> morfina,<sup>14</sup> entre otros.

Se han propuesto y ensayado con éxito varios tipos de polímeros inorgánicos y orgánicos, aunque la preferencia general se orienta hacia los polímeros acrílicos altamente reticulados. Estos materiales poseen alta capacidad de reconocimiento molecular selectivo, característica de los receptores biológicos que incluye la selectividad enantiomérica y presentan a la vez grandes ventajas



frente a estos, como estabilidad térmica, química y costo de producción muy bajo.<sup>15</sup>

A pesar de que los materiales impresos molecularmente ya tienen un nicho de aplicación, a saber, la Extracción en Fase Sólida, para la cual son comercializados, se requieren más trabajos para hacer de ellos una alternativa real o complemento de biomoléculas. En particular, se requiere de materiales que puedan ser viables para emplear disolventes acuosos y formas de remoción de la plantilla en un cien por ciento. Si al menos alguno de estos problemas pudieran resolverse y junto con la notable estabilidad de los PMIs, su bajo costo y fácil integración en los procesos de producción industrial normal, podrían hacer de ellos una alternativa atractiva para las biomoléculas en química analítica y otras aplicaciones. También es claro que se requiere de nuevas propuestas más sistemáticas para el diseño de PMIs que hagan más eficiente el proceso de obtención y así evitar el viejo método de ensayo y error. En consecuencia, los métodos combinatoriales<sup>16</sup> o computacionales<sup>17</sup> han sido propuestos para obtener PMIs óptimos específicos para una molécula blanco.<sup>18</sup> Afortunadamente, la industria, así como las agencias nacionales como internacionales tales como la comisión europea reconocen el gran potencial de los PMIs en química analítica y otras áreas lo cual da pauta a que su desarrollo sea más rápido y con ello su aplicación para resolver problemas reales en distintas áreas como la que nos ocupa, el área forense.

#### **8.4.1. Definición**

Técnica utilizada para la síntesis de polímeros orgánicos o inorgánicos capaces de reconocer moléculas utilizadas durante su síntesis denominadas plantillas o moléculas molde. El reconocimiento llegar a ser posible debido a que la estructura de tales polímeros incluyen áreas (sitios impresos) que pueden



---

interactuar específicamente (interacciones complementarias) con aquellos compuestos cuya estructura sea complementaria en forma y tamaño al sitio de impresión.<sup>19</sup>

Es un método usado para preparar polímeros sintéticos con sitios de reconocimiento selectivos predeterminados para un analito(s) de interés.<sup>20</sup>

Es un método versátil para crear matrices macromoleculares que presentan una conducta selectiva en el reconocimiento molecular.<sup>21</sup>

Se considera también como un método para preparar materiales que contienen sitios de reconocimiento de selectividad predeterminada conocido como Polimerización Moldeada.<sup>22</sup>



---

## 8.5. FUNDAMENTOS DE LA IMPRESIÓN MOLECULAR

### 8.5.1. Principio General de la Impresión Molecular

Los PMIs son matrices sintetizadas artificialmente que presentan, en teoría, la capacidad de reconocer e interactuar de forma específica con determinadas moléculas que produjeron en su estructura la huella correspondiente. Es decir, se trata de materiales biomiméticos que reproducen de un modo más básico el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos convencionales como: hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, etc. Son consideradas por varios autores como “anticuerpos artificiales” (plastibodies). Idealmente, éste es el comportamiento que cabría esperar; sin embargo, en la práctica no sucede así debido a la existencia de interacciones de distinta naturaleza.

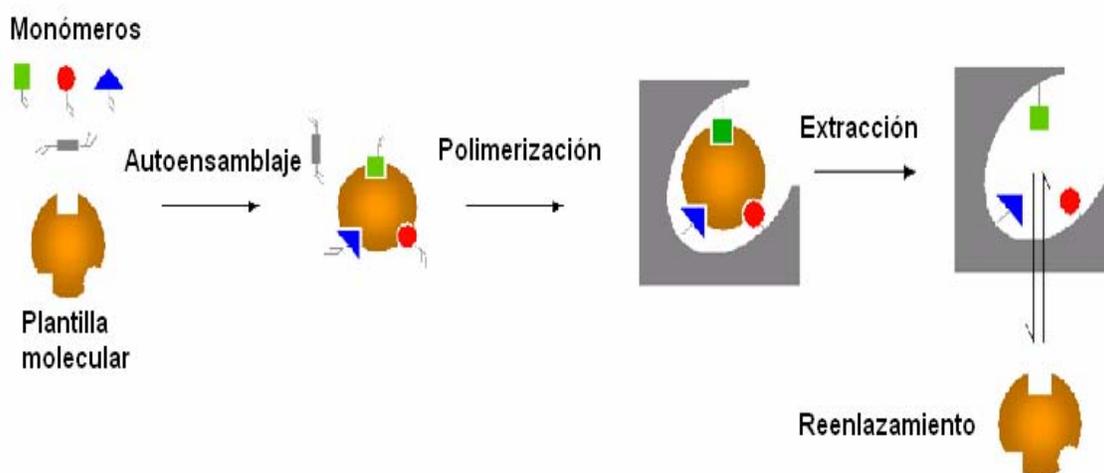
Los PMIs son sintetizados introduciendo la presencia de una plantilla molecular de entrada, la cual es diseñada para la impresión. Un prerequisite importante para su preparación es la formación de un complejo pre polimerizado que sea estable entre el monómero y la plantilla de las moléculas. Para obtener este complejo, la plantilla y el monómero se mezclan de manera apropiada y en un disolvente apropiado antes de la polimerización (generalmente en un medio aprótico).

El principio de Impresión Molecular para obtener materiales poliméricos impresos involucra tres etapas. En la primera etapa, denominada pre-ensamblaje, se prepara una mezcla de monómeros funcionales y la plantilla molecular o molécula molde. En esta etapa toma lugar un proceso de pre-polimerización entre los monómeros y la plantilla para formar un complejo, ya sea por medio de enlaces covalentes o por interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, ión-ión, ión-dipolo, etc.). En la segunda etapa, se lleva a cabo la polimerización del complejo pre-polimerizado con un exceso de agente reticulador para obtener la matriz



polimérica que contiene áreas con disposición de grupos funcionales determinados mediante la plantilla molecular. Finalmente, la tercera etapa consiste en la extracción de la plantilla de la matriz polimérica, ya sea por medio extracciones líquido-líquido (en el caso de la impresión no covalente) o por ruptura de enlaces químicos entre la plantilla y el polímero impreso (caso de la impresión covalente). Como resultado del proceso, el material impreso adquiere cavidades que, idealmente, deben estar relacionadas con la plantilla molecular en tamaño, forma y disposición de los grupos funcionales (figura 8).<sup>23</sup>

Después de la polimerización, el polímero se tritura y tamiza para obtener un cierto tamaño de partícula, y la plantilla se remueve mediante lavados repetidos con disolventes orgánicos. Las propiedades del polímero obtenido por esta tecnología son diferentes de las propiedades del polímero formado en la prepolimerización porque después de remover la plantilla, el polímero final permanece impreso. La impresión es complementaria a la molécula de entrada en tamaño y forma, en su propiedad fisicoquímica y capaz de reconocer y enlazarse repetidas veces con otras moléculas de entrada.



**Figura 8.** Principio de la Impresión Molecular.

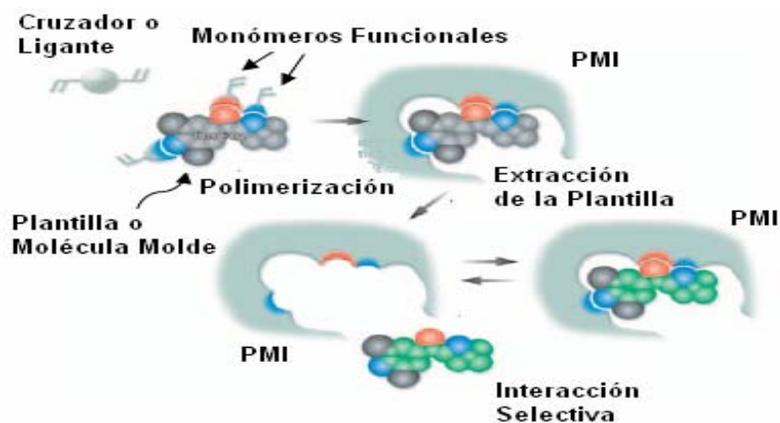


## 8.6. POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS (PMIs)

### 8.6.1. Definición

Son polímeros que forman matrices sintéticas obtenidas a partir de materiales con la capacidad de adoptar en su estructura la forma de las moléculas presentes en el medio en el que se polimerizan y permanecen en el material a modo de moldes moleculares, permitiendo así, el reconocimiento e interacción de forma específica con determinadas moléculas.

Se definen como fases poliméricas con determinada selectividad predeterminada para una molécula en particular o un grupo estructuralmente relacionado de moléculas (figura 9).<sup>24</sup>



**Figura 9.** Elementos participantes en la Impresión Molecular

### 8.6.2. Historia

El arte de la impresión molecular no es una nueva ciencia. Los primeros reportes de la técnica se remontan a los primeros años de la década de los 30s cuando el químico soviético M.V. Polyakov prepara una numerosa serie de placas de gel de sílice y observó que cuando las preparaba con un disolvente como aditivo, la sílice mostraba un fenómeno de mayor afinidad de enlace por el disolvente. Aunque Polyakov continuó con este trabajo hasta 1950 sus descubrimientos pocas veces salieron más allá de Europa del este.



Un estudio posterior también utilizó sílice pero no tuvo mayor impacto. En 1949, el estudiante más avanzado de Linus Pauling, Frank Dickey, publicó sus resultados de experimentos realizados con gel de sílice preparados en presencia de tinturas. Dickey observó que después de remover la tintura de la base, la sílice puede reenlazarse en la misma tintura de manera preferencial con relación a otras. La impresión sobre sílice continuó durante los años 50s y 60s pero el número de publicaciones sobre el área fueron pocas. Sin embargo, en 1972 hubo un cambio en la técnica de impresión molecular realizado por el grupo de Guenter Wulff, ellos lograron preparar la impresión molecular de un polímero orgánico. Wulff se basó en lo que ahora se conoce como **“teoría covalente”** para preparar el polímero orgánico molecularmente impreso capaz de diferenciar los enantiómeros del ácido glicérico. Posteriormente, desde los 70s hasta los 80s, el grupo de Wulff no dejó de publicar trabajos sobre esta misma propuesta. El segundo “boom” notable se dio en 1981 cuando Mosbach y Arshady reportaron PMIs orgánicos fundamentados únicamente en *interacciones no covalentes*. Esta propuesta se denominó **“teoría no covalente”** como oposición a la postulada por Wulff, y fue así que esta propuesta, tan simple y con una metodología aparentemente trivial, trajo consigo la explosión de la impresión molecular que se dio durante los años 90s. Hoy en día, el debate de ambas propuestas continúa. Sin embargo, se ha aceptado que tienen ventajas y desventajas. En 1995, Whitcombe y col.<sup>25</sup> propusieron una teoría intermedia que pareció combinar las ventajas de las dos propuestas, denominada **“semicovalente”** la cual depende de las interacciones covalentes durante la etapa de pre-polimerización pero requiere de interacciones no covalentes durante el proceso de reenlazamiento. Lo importante aquí es que para mejorar el subsecuente enlazamiento geométrico no covalente, el grupo de investigación propuso incorporar un grupo funcional que sacrificarían posteriormente ya que estaba diseñado para perderse durante la remoción de la plantilla. Sin embargo, la propuesta no covalente es hasta el momento por mucho la más utilizada en la síntesis de PMIs.<sup>6</sup>



### 8.6.3. Características de los PMIs

Independientemente de las propiedades de reconocimiento molecular de los Polímeros Molecularmente Impresos, sus características físicas y químicas son altamente importantes. Estos materiales presentan resistencia a distintos factores ambientales que pueden producir degradación. Así, los PMIs son extraordinariamente estables a tensiones mecánicas, temperaturas y presiones elevadas, tratamientos con ácidos, bases o iones metálicos y al empleo de distintos disolventes. El tiempo de vida media de los polímeros también llega a ser elevado: su almacenamiento por varios años a temperatura ambiente permite, aparentemente, conservar su desempeño. Además, los polímeros se pueden utilizar repetidamente hasta 100 veces por periodo de hasta 8 años sin que puedan perder su capacidad de “memoria”. En comparación con aquellos compuestos biológicos de origen natural, los cuales a menudo son proteínas, estos materiales ofrecen ventajas altamente competitivas. Algunas de las características de los PMIs se muestran en la tabla 1.<sup>26</sup>

**Tabla 1. Características de los Polímeros Molecularmente Impresos**

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
Estabilidad Física	Resistentes a mecanismos de tensión, temperatura y presiones elevadas
Estabilidad química	Resistentes a medios ácidos, bases, distintos disolventes orgánicos y iones metálicos
Tiempo de vida media elevado	Mayor a 8 años sin disminución de su desempeño
Capacidad	0,1 mg- 1,0 mg/ g e polímero
Capacidad de reconocimiento	Uso repetido de más de 100 veces sin disminución
Porcentaje de recuperación	Mayor a 99,0%



---

#### **8.6.4. Ventajas y Desventajas**

Las ventajas y desventajas que ofrecen los PMIs se mencionan a continuación.

##### **8.6.4.1. Ventajas de los PMIs**

1. Sensibilidad y selectividad elevadas
2. Poseen una mayor estabilidad que los sistemas biológicos de reconocimiento.
3. Posibilidad de desarrollar PMIs destinados a muy diversos analitos.
4. Teóricamente se puede predecir el grado de especificidad
5. Producción de bajo costo a escala industrial.
6. Tiempo de vida largo: estabilidad química, térmica y mecánica altas.

##### **8.6.4.2. Desventajas de los PMIs**

1. Tecnología en desarrollo en el ámbito de los biosensores.
2. En general, las constantes de afinidad son bajas, es decir, que la tendencia del analito y de los PMIs a unirse es pequeña. Esto implica mayores tiempos de análisis.
3. Requiere altas concentraciones de moléculas molde
4. En el procedimiento de síntesis de los PMIs conlleva múltiples etapas y resulta laborioso.
5. Dificultad para operar en medios acuosos porque no se produce el reconocimiento del analito.



## 8.7. IMPRESIÓN COVALENTE E IMPRESIÓN NO COVALENTE

Se han propuesto dos teorías para la síntesis de PMIs, las cuales difieren en el tipo de enlace entre el monómero y la plantilla molecular. Los principales mecanismos de preparación de PMIs se dividen en covalentes y no covalentes. Aunque también hay una propuesta intermedia denominada semicovalente en la que se efectúan interacciones de coordinación (figura 10).

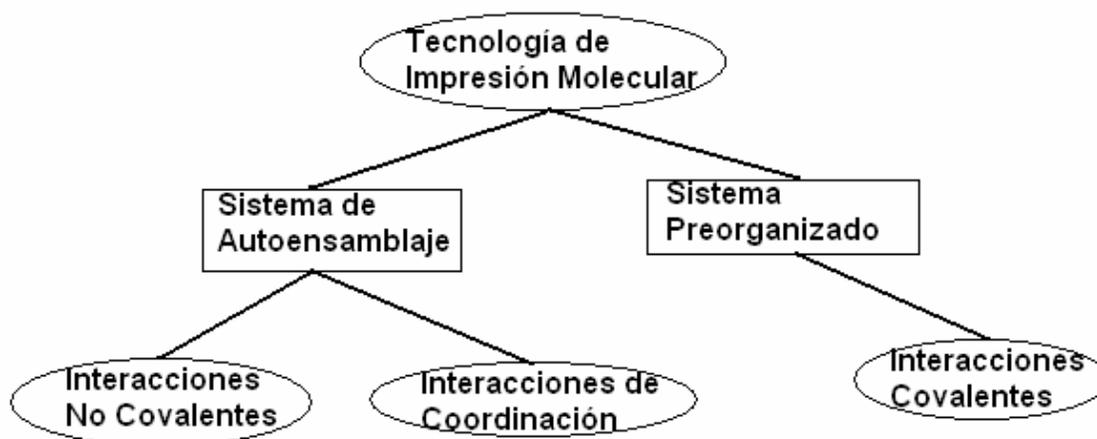


Figura 10. Teorías de la Impresión Molecular.

### 8.7.1. Impresión Covalente

Esta primera propuesta fue realizada por Wulff y Sarán la cual implica una reacción química entre las moléculas molde (plantilla) y el monómero funcional formando un polímero impreso enlazado covalentemente y posteriormente la remoción de la plantilla del polímero al final del proceso por ruptura del enlace (hidrólisis).<sup>27</sup>

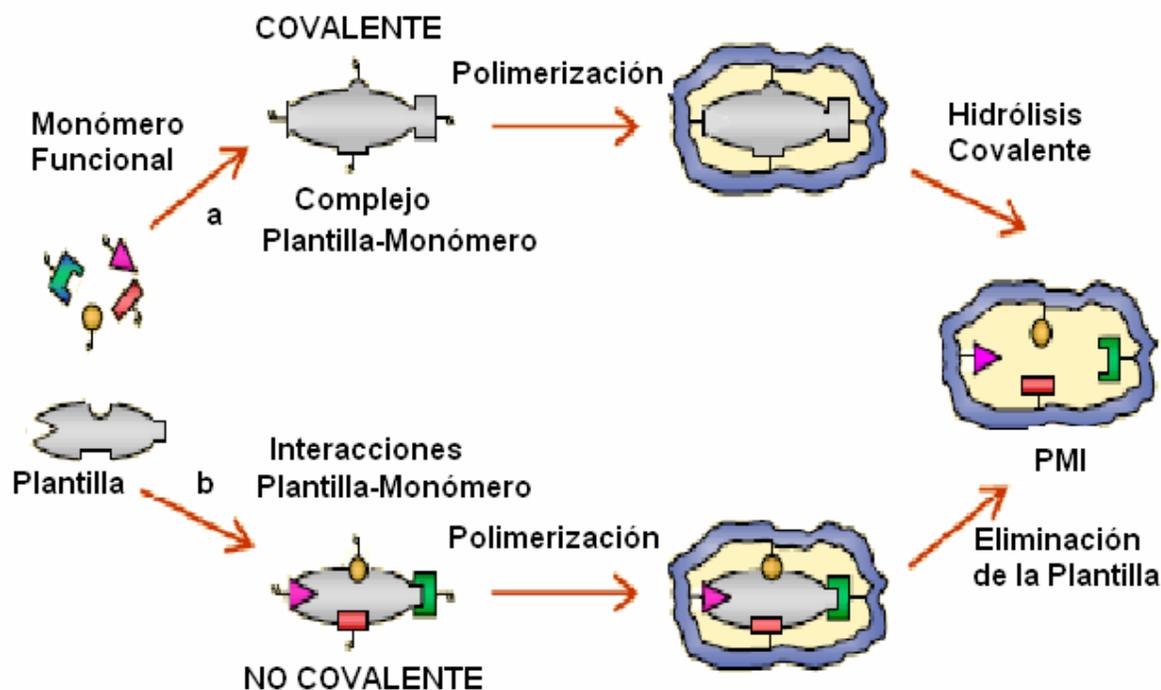
La ventaja de la propuesta covalente es que ofrece homogeneidad y eficiencia de los sitios de enlace en los PMIs obtenidos debido a la formación de enlaces químicos. Sin embargo, tiene limitaciones como el hecho de solo obtener pares combinados de monómero-plantilla en la cual la formación y ruptura de los enlaces covalentes es un proceso reversible que se presenta bajo condiciones relativamente suaves.



### 8.7.2. Impresión No Covalente

Es la segunda propuesta, la cual se conoce como propuesta no covalente, se encontró que puede ser más versátil; Arshaday y Mosbach<sup>12</sup>, en 1981, son los primeros en describir esta propuesta. En la síntesis no covalente, se utiliza una propiedad importante de las moléculas poliméricas. Ésta propiedad forma una base para la organización de las estructuras del complejo biológico. Esta es la capacidad de las macromoléculas de auto organizarse o auto ensamblarse. Las fuerzas direccionales de asociación de la plantilla y moléculas monoméricas pueden ser varias interacciones no covalentes: ión-ión, ión-dipolo, dipolo-dipolo e interacciones hidrofílicas y puentes de hidrógeno. La evidente debilidad de esos enlaces se puede compensar con el gran número de sitios de enlaces. El método de interacciones no covalentes en la impresión molecular es el modelo que se asemeja más al modelo de reconocimiento natural.

La técnica no covalente es más versátil, ya que el rango de plantillas moleculares es más elevado en comparación con la técnica covalente (figura 11).

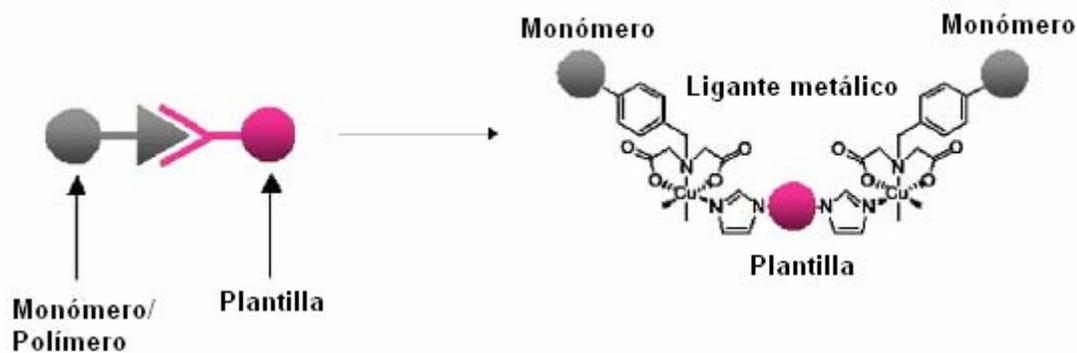


**Figura 11.** Representación gráfica de las teorías propuestas para la formación de PMIs.



### 8.7.3. Impresión Semicovalente.

Se considera como un híbrido de la teoría covalente y no covalente. La síntesis por esta vía se realiza mediante complejos metálicos. Como resultado, el complejo metálico funciona como ligante entre el o los monómeros funcionales y la plantilla molecular permitiendo la disposición de los grupos funcionales para el reenlazamiento mediante puentes de hidrógeno (figura 12). En la etapa de prepolimerización se lleva a cabo la formación de los enlaces covalentes y posterior al proceso de polimerización, durante el reenlazamiento del analito a los PMIs, se dan las interacciones no covalentes. La separación se realiza en presencia de la plantilla y por diferencias en la estabilidad entre ambos.<sup>6</sup>



**Figura 12.** Teoría Semicovalente de la síntesis de PMIs.

En la práctica diaria, la teoría no covalente es más utilizada en relación al método covalente debido a la formación de un complejo por mezcla de una plantilla con un monómero funcional en un disolvente adecuado. No se requiere modificación química, y la plantilla se remueve mediante lavados consecutivos del polímero con un disolvente o mezcla de disolventes. La gran mayoría de los PMIs actualmente conocidos que han encontrado un uso en la química analítica son sintetizados por el método de impresión molecular no covalente.



---

## 8.8. POLIMERIZACIÓN

### 8.8.1. Métodos de Polimerización

#### 8.8.1.1. Polimerización por radicales libres

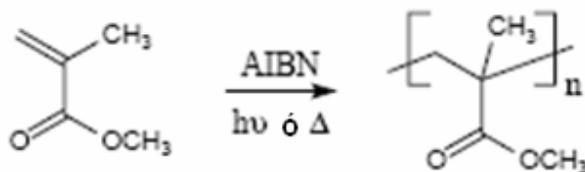
La polimerización por radicales libres (o crecimiento en cadenas) es el método sintético más importante del que se dispone hoy en día para la transformación de un monómero en polímero, y es aprovechada enormemente en la industria para la producción a gran escala de un número importante de plásticos comerciales. Numerosos monómeros vinílicos se pueden polimerizar de manera efectiva con excelentes rendimientos mediante métodos de polimerización por radicales libres, incluyendo etileno, estireno y metacrilato de metilo los cuales son de particular importancia en la industria. La polimerización por radicales libres se puede llevar a cabo en grandes cantidades ya sea bajo condiciones suaves (por ejemplo a temperatura ambiente y presión normal) o en solución, y resulta tolerante a la presencia de distintos grupos funcionales en monómeros e impurezas presentes en el sistema (por ejemplo agua). Por estas razones así como por el hecho de que se dispone de muchos monómeros vinílicos a bajo costo, hacen de este método, el ideal para la preparación de PMIs.

El mecanismo de polimerización por radicales libres se caracteriza por presentar tres estados distintos: (1) iniciación, (2) propagación, y (3) terminación. De estos es importante enfatizar dos puntos. Primeramente, en una polimerización típica por radicales libres la velocidad de propagación (crecimiento en cadena) es usualmente mucho más rápida que la velocidad de iniciación de tal manera que se inicia lo más pronto posible una nueva cadena polimérica para aumentar la propagación y obtener un peso molecular elevado en un tiempo relativamente corto antes de que termine la reacción. Aquí lo que más interesa es que el peso molecular elevado se pueda obtener en el sistema aunque la cantidad de monómero consumido sea bajo.<sup>28</sup>



Segundo, la fuente de radicales libres (el iniciador) esta normalmente activa al término de la polimerización, de tal forma que si uno está disponible para tomar un muestra del sistema en determinado momento, uno puede observar la presencia de monómeros en reposo y el iniciador propagando la cadena polimérica así como las cadenas de alto peso molecular terminadas (repentinamente).

Muchos iniciadores químicos con propiedades químicas diferentes se pueden utilizar como fuente de radicales en la polimerización por radicales libres. Normalmente los utilizan en bajos niveles en comparación con los monómeros, por ejemplo 1% de masa, o 1 % de mol con respecto al total moles de enlaces dobles polimerizables. La velocidad y modo de descomposición de un iniciador para radicales puede tener varias causas y distintas vías de terminación, incluyendo calor, luz y por medios químicos/electroquímicos dependiendo de su naturaleza química. Por ejemplo, el iniciador azobisisobutironitrilo (AIBN) se puede descomponer convenientemente por fotólisis (UV) o termólisis para obtener los radicales necesarios para iniciar la propagación de un número de monómeros vinílicos. Un ejemplo claro se ilustra en la figura 13 en donde AIBN genera los radicales necesarios para polimerizar al metacrilato de metilo, ya sea bajo condiciones térmicas o fotoquímicas para dar poli (metilmetacrilato).<sup>28</sup>

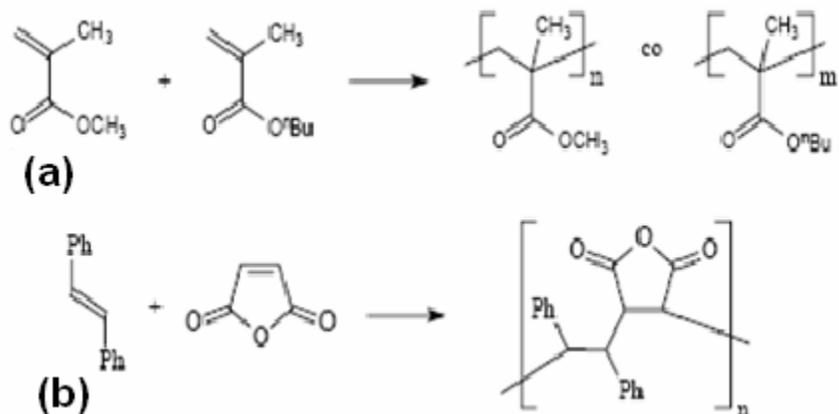


**Figura 13.** Conversión del monómero metacrilato de metilo mediante polimerización por radicales libres a poli (metilmetacrilato)



### 8.8.1.2. Copolimerización por radicales libres

A menudo es la técnica ideal, pero no es exclusiva en los círculos de la impresión molecular para polimerizar simultáneamente (copolimerizar) dos o más monómeros vinílicos en el mismo matraz de reacción para dar copolímeros (opuestos a los homopolímeros, los cuales surgen de la polimerización de un monómero simple). Esto permite preparar productos con propiedades diferentes a los homopolímeros. Por ejemplo, el metacrilato de metilo se puede copolimerizar con un monómero más hidrofóbico como el metacrilato de butilo para dar un copolímero, para cualquier cadena polimérica dada, pudiendo presentar una distribución estadística de las unidades metacrilato de metilo y butilo a lo largo de la cadena del polímero. La distribución aleatoria puede depender de las concentraciones relativas de dos monómeros en el suministro previo a la polimerización (figura 14a). El copolímero lineal resultante, poli (metil metacrilato-co-butil metacrilato), puede ser soluble en un disolvente termodinámicamente compatible.<sup>28</sup>



**Figura 14.** Copolimerización de radicales libres de: a) metilmetacrilato con *n*-butilmetacrilato, y (b) estilbeno y anhídrido maleico. Polímero (a) es un copolímero probabilístico mientras que el polímero (b) es un copolímero específico.



Se debe tener especial cuidado en la utilización de la copolimerización por radicales libres tomando en cuenta las reactividades relativas de los monómeros constituyentes y observando que no todos los monómeros se consumen a la misma velocidad, de otro modo la composición química de los productos copolimerizados y la distribución de las unidades monoméricas con los copolímeros puede ser difíciles de predecir únicamente a partir de la composición monomérica dada.

Como se ha ilustrado en ejemplos sobre esta idea, ciertos pares de monómeros copolimerizados dan específicamente copolímeros alternos (Por ejemplo el estilbena y el anhídrido maleico, figura **14b**) sin considerar la composición monomérica dada, mientras que otros pares de monómeros (Por ejemplo maleimida y anhídrido maleico) copolimerizan ineficientemente o nada. También se ha señalado que para un par de monómeros dados, la composición molecular del copolímero obtenido y la distribución de las unidades monoméricas dentro del copolímero también depende de las concentraciones relativas del monómero y su variación con respecto al tiempo.

Afortunadamente, las reactividades de muchos de los monómeros comunes son conocidas y han sido reportadas, normalmente en la proporción en la que reaccionan para dar pares de monómeros. En la copolimerización por radicales libres de dos monómeros vinílicos, A y B, donde el monómero A es el último en salir de la propagación de la cadena polimérica, la constante de velocidad de la reacción para la reacción de este radical polimérico con el monómero A esta dada por  $k_{AA}$ , y la constante de la velocidad para la reacción del mismo radical polimérico con el monómero B esta dada por  $k_{AB}$ . La proporción de reactividad para el monómero A,  $r_A$ , con respecto al monómero B, esta definida como la proporción de dos constantes de velocidad, por ejemplo  $r_A = k_{AA}/k_{AB}$ . Mediante un análisis semejante, la proporción de reactividad para el monómero B,  $r_B$ , con respecto al monómero A, donde el monómero B es el último en salir de la propagación de la cadena polimérica, esta dada por  $r_B = k_{BB}/k_{BA}$ .



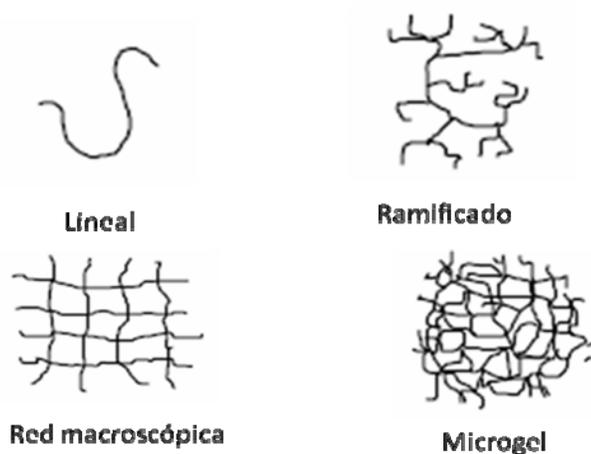
En la copolimerización por radicales libres de dos monómeros vinílicos, A y B, la velocidad en la cual el monómero es copolimerizado depende de la reactividad inherente al monómero y el radical derivado del mismo monómero. Pero también ahora de aquellos valores de reactividad comparados con los correspondientes valores para el segundo monómero. En la práctica, a menudo aparece una película compleja, especialmente cuando las consideraciones de propagación del monómero son también influenciadas por otros factores experimentales como la temperatura de reacción y la concentración del monómero. Sin embargo, la proporción de reactividad para los monómeros A y B, los cuales se expresan normalmente como  $r_A$  y  $r_B$ , respectivamente, se pueden utilizar para predecir el resultado final de la una copolimerización dada, involucrando A y B.

Los valores de reactividad normalmente van de un rango de 0-1, pero pueden llegar a ser mucho más altos en algunas instancias. Una proporción baja en los valores de reactividad implica una baja reactividad mientras que un valor alto implica una alta reactividad. Si los dos monómeros, cuando están combinados el uno o el otro, tienen un valor moderado ( $\sim 0,5$ , por ejemplo el estireno y el metacrilato de metilo) entonces el copolímero formado tendrá una composición similar pero no necesariamente idéntica para el monómero dado. Si ambos valores tienen un valor bajo ( $\sim 0$ , por ejemplo estilbena y anhídrido maleico) entonces la copolimerización puede ser baja y tiene una tendencia a formar específicamente copolímeros alternos. Finalmente si una proporción del valor de reactividad es alto (por ejemplo, estireno) al mismo tiempo que el otro valor es relativamente bajo ( $\sim 0$ , acetato de vinilo) entonces la tendencia puede ser el consumo de un monómero preferentemente casi al inicio de la copolimerización y el segundo monómero casi al final del mismo causando un aumento para una mezcla reducida de homopolímero A y homopolímero B predominantemente, al contrario que un polímero.



### 8.8.1.3. Polímeros reticulados

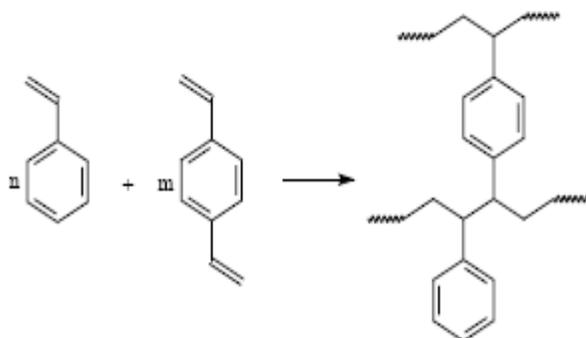
Todos los procesos de polimerización mencionados previamente involucran la propagación (crecimiento) de polímeros derivados de monómeros con un simple grupo polimerizable, de aquí en adelante se referirá a ellos como mono-monómeros funcionales o simplemente, monómeros funcionales. Estos, normalmente polimerizan para dar macromoléculas lineales que son solubles en disolventes químicamente compatibles. Cuando estos mono-monómeros funcionales se polimerizan, cualquiera de ellos o en combinación con un co-monómero(s), el resultado final es completamente diferente y esto permite la preparación de un gran número de arquitecturas poliméricas no lineales de un alto valor comercial. Estos materiales pueden ser solubles o insolubles, y puede ser convenientemente clasificados como moléculas ramificadas, microgeles y cadenas o redes macroscópicas (figura 15). Los monómeros multifuncionales son más comúnmente referidos como reticuladores, y funcionan uniendo químicamente dos o más cadenas poliméricas lineales.<sup>28</sup>



**Figura 15.** Representación esquemática ilustrando polímeros con diferentes topologías: Lineal, ramificado, red macroscópica y microgel.



Los polímeros ramificados, microgeles y cadenas macroscópicas pueden a menudo prepararse según convenga el caso, ya sea por polimerización por radicales libres o por cadenas lineales. Por citar un ejemplo tecnológicamente relevante, la resina de Merifield ha tenido aplicaciones en catálisis química y extracción en fase sólida y puede prepararse fácilmente por copolimerización del estireno (como el monómero funcional) con divinilbenceno (como el agente reticulante) para dar una cadena macroscópica de poli (estireno-co-divinilbenceno), cuya estructura química puede determinarse (figura 16).



**Figura 16.** Representación esquemática de la red del polímero reticulador originando la copolimerización del estireno con p-divinilbenceno.

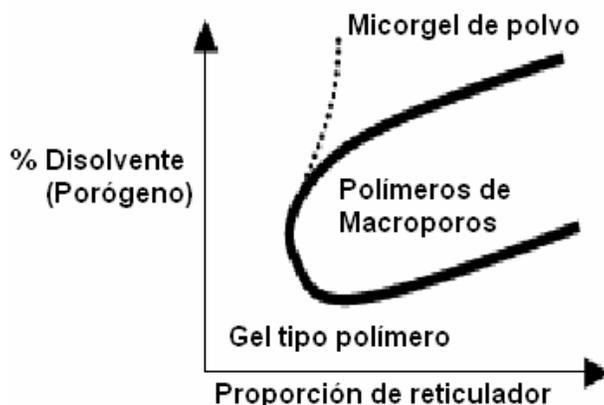
En el campo de la impresión molecular, las redes poliméricas macroscópicas han sido el tipo de polímeros no lineales más ampliamente sintetizados y estudiados, debido a que pueden ser especies insolubles que dan rigidez e imparten estabilidad mecánica para un sitio de enlace impreso. Se han encontrado algunos reportes en la literatura describiendo la impresión de microgeles (solubles) y macromoléculas lineales, pero estas son relativamente pocas.



---

#### **8.8.1.4. Polímeros tipo gel, macroporos poliméricos y microgeles de polvos**

En una copolimerización están incluido, un monómero monofuncional y un monómero multifuncional, dos de los más importantes parámetros experimentales que gobiernan la naturaleza física del producto son: 1) la proporción nominal del reticulador (ligando), definido como el porcentaje de reticulador con respecto al total de moles de monómero, 2) el volumen y naturaleza del disolvente en el cual la polimerización se lleva a cabo. De la recopilación de información obtenida de numerosas polimerizaciones reticuladas, donde los volúmenes de reticulador y el volumen de disolvente han sido sistemáticamente variados, es posible construir un diagrama de pseudofase (figura 17) para predecir la naturaleza física probable de un polímero. El diagrama pseudofase consta, principalmente de tres regiones aparentes, por ejemplo los polímeros tipo gel, macroporos poliméricos, y polvos microgélidos. Al mismo tiempo es posible hacer cierto número de generalizaciones, esto es importante para apreciar que los límites entre los diferentes tipos de polímeros en el diagrama de pseudofase son un tanto borrosos, esto es consecuencia de la influencia de ciertos factores además de la proporción del reticulador y el volumen del disolvente (aunque en menor extensión), y que llevará a variaciones inevitables en el comportamiento de un tipo de polímero a otro, por ejemplo el estireno respecto al metacrilato).<sup>28</sup>



**Figura 17.** Diagrama de pseudofase del polímero mostrando claramente tres diferentes regiones, por ejemplo polímeros tipo gel, polímeros macroporosos, y polvos de microgel.

En proporciones relativamente bajas de reticulador, por ejemplo <5%, o en proporciones altas del mismo y en presencia de volúmenes bajos de disolvente, llegan a ser termodinámicamente compatibles con la red polimérica, y entonces la situación puede originar que la separación de la red polimérica de la fase no se presente durante la polimerización. En tal caso el producto es un polímero tipo gel ligeramente solvatado el cual colapsa en seco para formar un polímero amorfo tipo gel vídrioso. Tales materiales típicamente poseen áreas superficiales muy bajas en cuanto a especificidad en su estado seco considerando las cadenas poliméricas que llegan a estar en estrecho contacto molecular, aumentando significativamente la termodinámica de aquellos que son buenos disolventes y tienen propiedades mecánicas pobres especialmente cuando la proporción de reticulador es muy bajo. Los polímeros tipo gel han encontrado poca aplicación en la impresión molecular hasta la fecha, debido a sus propiedades mecánicas relativamente pobres las cuales hacen de ellos menos atractivo para aplicaciones que involucran un flujo por completo, como por ejemplo la cromatografía de líquidos de alta resolución.



En proporciones relativamente altas del reticulador, y/o en presencia de volúmenes altos de disolvente, el crecimiento de la matriz polimérica es capaz de separar la fase del medio de polimerización aumentando la cantidad de polímeros macroporosos. El término “macroporo”, es usado explícitamente por el hecho de que los polímeros son poros pero eso no quiere decir que implica alguna otra cosa acerca de la morfología detallada del polímero, por ejemplo el tamaño promedio del poro o el tamaño de distribución del poro. Los polímeros macroporosos se caracterizan por tener permanentemente estructuras porosas, aún en estado seco, y áreas superficiales mucho más específicas que las resinas tipo gel, y aún con disolventes termodinámicamente no compatibles pueden acceder a los poros. Además, los polímeros macroporosos son mecánicamente más robustos que los polímeros tipo gel lo cual explica los altos niveles de reticulador presente. Por estas razones es que se prefieren los polímeros macroporosos cuando se desea desarrollar de manera efectiva PMIs.

Un fenómeno interesante se observa cuando el volumen de disolvente usado se incrementa más allá de lo normalmente utilizado para preparar polímeros macroporosos. Bajo condiciones más diluidas, las partículas de polímero primario que se forman, las cuales normalmente se fusionan para formar polímeros tipo gel o polímeros macroporosos bajo condiciones concentradas, permanecen en un estado dispersado y son a menudo recuperados directamente como polvos. Las partículas primarias son conocidas como microgeles y los productos por consiguiente como microgeles de polvo. Recientemente, los microgeles han tenido un incremento importante ocasionando el interés de la impresión molecular, y junto con el reciente desarrollo en la polimerización por emulsión, permiten la síntesis de rutina de polímeros esféricos de tamaño de micras con bastante buenos rendimientos.



---

## 8.9. SÍNTESIS DE PMIs

### 8.9.1. Componentes

- a) *El analito* de interés actúa como molde o plantilla
- b) *Los monómeros funcionales* que interaccionan con el analito y para cuya elección debe considerarse la naturaleza química del mismo (ácida, básica, ión metálico)
- c) *Los reticuladores* que contribuyen a estabilizar la estructura del polímero.
- d) *Otros compuestos*: iniciadores de la polimerización, disolventes para la fase de síntesis, disolventes para la extracción del analito.

### 8.9.2. Síntesis

El diseño y síntesis de PMIs puede ser algo intimidante en el ejercicio profesional y no es para menos, ya que el número total de variables experimentales involucradas, como por ejemplo la naturaleza y niveles de plantilla, monómero(s) funcional(es), reticulador(es), disolvente(s) e iniciador(es), el método de iniciación y duración de la polimerización hacen de ello un proceso que implica bastante planeación. Afortunadamente, un buen número de “reglas empíricas” han aparecido en la literatura siendo útiles al respecto, sin embargo esto no es suficiente para sentar las bases del proceso de polimerización por radicales libres. Sin embargo contando con la información actual se pueden realizar varias consideraciones para poder eficientar el diseño y síntesis de los PMIs para un determinado analito.<sup>28</sup>

A continuación, se explicara el papel y función los elementos que intervienen en la síntesis de PMIs tales como: La molécula molde o plantilla, monómeros funcionales, reticuladores, disolventes e iniciadores.



### **8.9.2.1. Plantilla o Molécula Molde**

En todos los procesos de impresión molecular la plantilla es de importancia fundamental ya que ésta dirige la organización de los grupos funcionales disponibles para los monómeros funcionales. Desafortunadamente y por varias razones, no todas las plantillas se pueden emplear debido a su baja sensibilidad al moldeado. En términos de compatibilidad con la polimerización por radicales libres, las plantillas tienen que ser, idealmente, estables y químicamente inertes bajo las condiciones de polimerización. Así, se tienen que idear estrategias de impresión que permitan el uso de la plantilla en el proceso de polimerización. Por ello, es necesario realizar ciertos cuestionamientos sobre la plantilla, tales como: (1) la plantilla es capaz de soportar algún grupo polimerizable?, (2) la plantilla proporciona la funcionalidad para que pueda potencialmente inhibir o retardar una polimerización por radicales libres, por ejemplo un grupo intermediario como un tiol o una hidroquinona ?, y (3) la plantilla podrá ser estable a temperaturas moderadamente elevadas (por ejemplo en o alrededor de 60 °C si el AIBN es utilizado como inhibidor químico) o en exposiciones a radiación UV?

### **8.9.2.2. Monómeros Funcionales**

Son los responsables de las interacciones en los sitios de enlace impresos y para protocolos de impresión molecular no covalente, normalmente se utiliza un exceso en relación al un número de moles de plantilla empleados, favoreciendo la formación del complejo plantilla-monómero funcional (la proporción de la plantilla respecto al monómero funcional es de 1:4, y aumenta en el caso de que la impresión sea diferente). Está claro que es importante coincidir la funcionalidad de la plantilla con la de un monómero funcional en un molde complementario (por ejemplo, un donador con un aceptor de hidrógeno) para maximizar la formación del complejo y así el efecto de impresión.

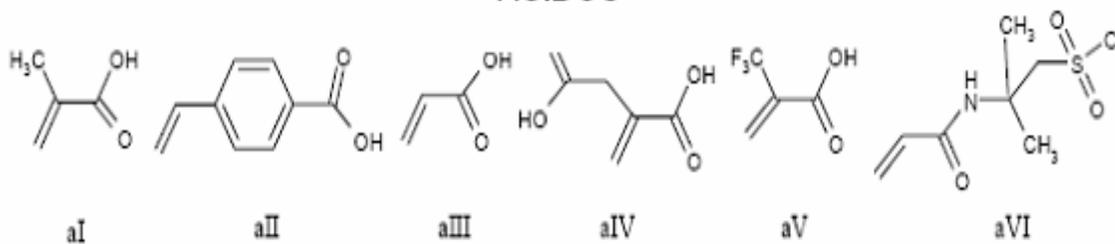


Cuando dos o más monómeros funcionales se utilizan simultáneamente en un “cocktel” de polimerización, también es importante tener en mente la proporción estequiométrica de los monómeros para garantizar que la copolimerización sea viable. Anteriormente, también era importante hacer notar que la complejación de la plantilla por el monómero funcional podía verse influenciada hasta cierto punto, por la reactividad del monómero como resultado de perturbaciones electrónicas o estéricas de éste.

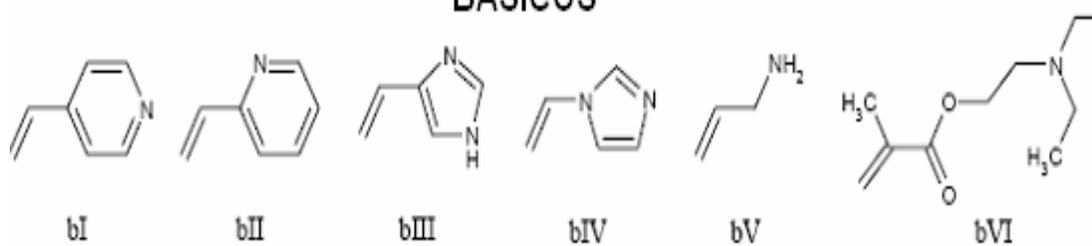
Una gran cantidad de monómeros funcionales con diversas estructuras químicas y polaridades diferentes están disponibles comercialmente y muchos más se pueden preparar mediante una estrategia de síntesis adecuada. En la figura 18 se observan las estructuras químicas de una selección de monómeros funcionales más importantes. Estos compuestos son los siguientes: **Ácidos** como aI) ácido metacrílico (MAA); aII) ácido *p*-vinilbenzoico; aIII) ácido acrílico (AA); aIV) ácido itacónico; aV) ácido 2-(trifluorometil)-acrílico (TFMAA); aVI) ácido acrilamido-(2-metil)-propano sulfónico (AMPSA). **Básicos** como bI) 4-vinilpiridina (4-VP); bII) 2-vinilpiridina (2-VP); bIII) 4-(5)-vinilimidazol; bIV) 1-vinilimidazol; bV) alilamina; bVI) *N,N*-dietil-aminoetil-metacrilamida (DEAEM); bVII) *N*-(2-aminetil)-metacrilamida; bVIII) *N,N*-dietil-4-estirilamidina; bIX) *N,N,N*-trimetil aminoetilmetacrilato; bX) *N*-vinilpirrolidona (NVP); bXI) éster etil-urocánico, y **Neutros** como nI) acrilamida; nII) metacrilamida; nIII) 2-hidroxietil metacrilato (2-HEMA); nIV) ácido trans-3-(3-piridil)-acrílico; nV) acrilonitrilo; nVI) metilmetacrilato (MMA); nVII) estireno; nVIII) etilestireno.



## ÁCIDOS



## BÁSICOS



## NEUTROS

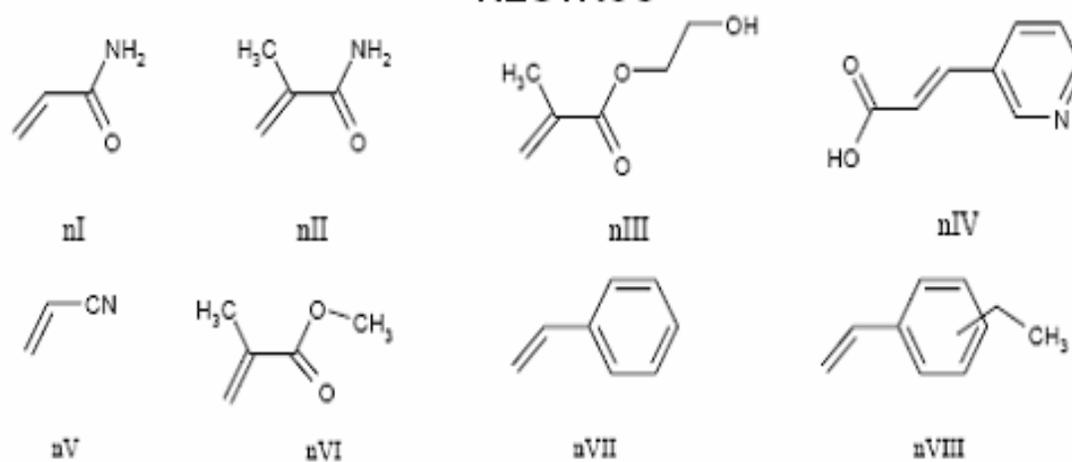


Figura 18. Lista de monómeros funcionales.

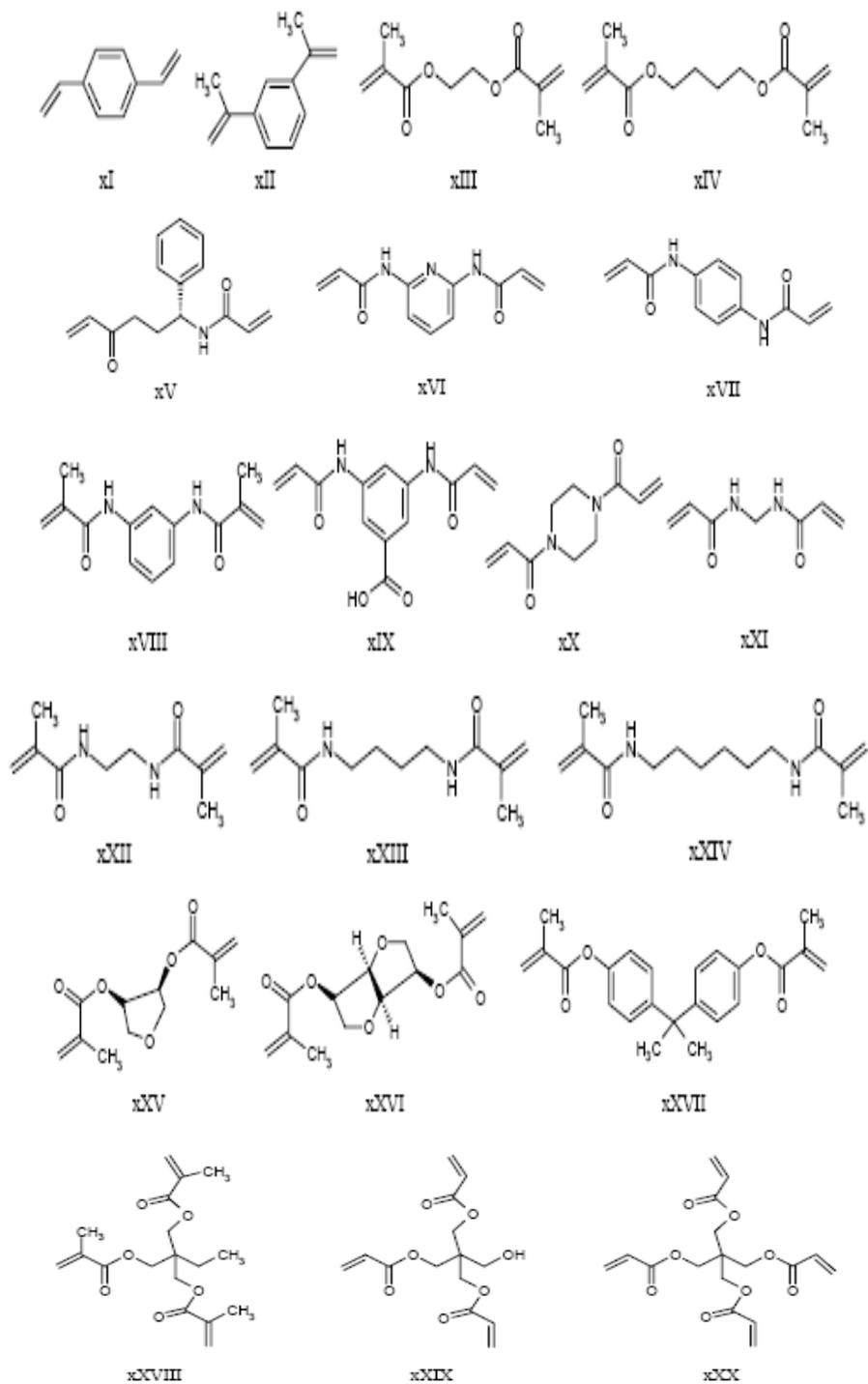


### 8.9.2.3. Reticuladores o Ligantes

En un polímero impreso el reticulador cumple con tres funciones principales. *La primera*, controla la morfología de la matriz polimérica determinando si es tipo gel, macroporo o polvo de microgel. *Segundo*, estabiliza el sitio de enlace impreso. *Finalmente*, proporciona estabilidad mecánica a la matriz polimérica. Se ha escrito mucho respecto al efecto del reticulador sobre la conducta en el reconocimiento molecular de los polímeros impresos, pero desde el punto de vista de la polimerización, se prefieren las proporciones elevadas de reticulador para penetrar completamente a los materiales porosos y así generar materiales con adecuada estabilidad mecánica. Los polímeros con proporciones elevadas de reticulador en más de un 80% es el estándar utilizado.<sup>28</sup>

Por la misma razón de que uno puede relacionar la proporción de reactividad de los monómeros funcionales en un cocktail de polimerización para garantizar la incorporación suave de los co-monómeros, la proporción de reactividad del reticulador se debe idealmente relacionar con los monómeros funcionales. Como se ha visto, la proporción reactiva del reticulador puede no conocerse; en tal caso las aproximaciones algunas veces se pueden realizar a través de estudios de los valores de estructuras análogas. Esto ocasiona que los grupos vinilo puedan ser químicamente distintos en monómeros multifuncionales con distinta proporción reactiva, por ejemplo diferentes grupos vinilo se pueden incorporar a diferentes velocidades al polímero.

Actualmente se conocen cierto número de reticuladores compatibles con la impresión molecular, muchos están disponibles comercialmente y pocos son capaces de complejarse simultáneamente con la plantilla permitiendo la actuación de los monómeros funcionales. En la figura 19 se muestran varias estructuras químicas bien conocidas de los reticuladores o ligantes.



**Figura 19.** Lista de reticuladores utilizados para la impresión molecular.



Estos son xl: p-divinilbenceno(DVB); xli: 1,3-diisopropenil benceno (DIP); xlii: etilenglicol dimetacrilato (EGDMA); xliiii: tetrametilen dimetacrilato (TDMA); xliv: *N,O*-bisacriloil-L-fenilalaninol; xlv: 2,6-bisacriloilamidopiridina; xlvi: 1,4-fenilen diacrilamida; xlvii: *N,N'*-1,3-fenilenbis(2-metil-2-propenamida) (PDBMP); xlviii: ácido 3,5-bisacrilamido benzoico; xlix: 1,4-diacriloil piperazina (DAP); xlxi: *N,N'*-metilenbisacrilamida (MDAA); l: *N,N'*-etilen bismetacrilamida; lxi: *N,N'*-tetrametilen bismetacrilamida; lxii: *N,N'*-hexametilen bismetacrilamida; lxiii: Anhídrueritritol dimetacrilato; lxiiii: 1,4,3,6-dianhidro-D-sorbitol-2,5-dimetacrilato; lxv: isopropilenbis(1,4-fenilen) dimetilmetacrilato; lxvi: trimetilpropano trimetilmetacrilato (TRIM); lxvii: pentaeritritol triacrilato (PETRA); lxviii: pentaeritritol tetracrilato (PETEA).

#### 8.9.2.4. Disolventes o Porógenos

Los disolventes sirven para que todos los componentes en la polimerización, por ejemplo, la plantilla, el(los) monómero(s) funcional(es), el reticulador y el iniciador, estén dentro de una misma fase. Sin embargo, también cumplen con una segunda función importante como el hecho de ser los responsables de crear los poros en los polímeros macroporosos. Por esta razón, es completamente común referirnos al disolvente como un “porógeno”. Cuando los polímeros macroporosos llegan a prepararse, la naturaleza y nivel de porógeno se puede utilizar para controlar la morfología y el volumen total de los poros. De manera más específica, el uso de un disolvente termodinámicamente estable nos conduce a poder obtener polímeros con estructuras porosas bien desarrolladas y con áreas superficiales altamente específicas, por el contrario, el uso de un disolvente termodinámicamente pobre puede conducir a obtener polímeros con estructuras porosas poco desarrolladas y con áreas superficiales poco específicas. Así, el incremento del volumen de porógeno incrementa el volumen del poro.

Algunas veces la doble función del porógeno como disolvente y como agente formador de poros, se debe cambiar en una polimerización impresa no covalente para maximizar simultáneamente la formación del complejo plantilla-monómero funcional. Normalmente, esto implica que los disolventes apolares y apróticos como el tolueno, sean preferidos para estabilizar los puentes de



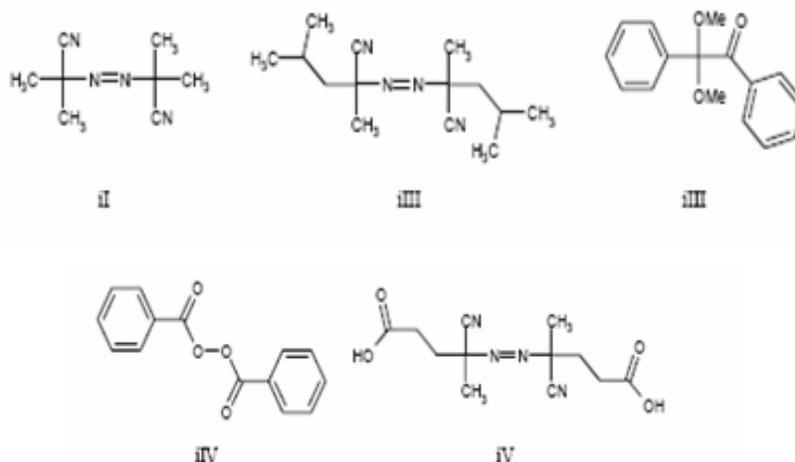
hidrógeno, sin embargo si las fuerzas hidrofóbicas se llegan utilizar para conducir a la formación del complejo entonces, el agua es un buen disolvente para realizar el cambio.

### 8.9.2.5. Iniciadores

Son compuestos que se descomponen en el agua formando “radicales” muy activos. La reactividad se transfiere a una partícula de monómero, la cual a su vez podrá sumarse a otra partícula de monómero sin perder su reactividad, iniciando la reacción en cadena.

No son catalizadores, ya que permanecen inalterables durante una reacción. Su elección dependerá del tipo de enlaces que se presenten en el proceso de polimerización. Por ejemplo, cuando se trata de enlaces no covalentes, se prefiere un método de polimerización a bajas temperaturas empleando iniciadores fotoquímicamente activos.

Las estructuras químicas de los iniciadores seleccionados para la polimerización se muestran en la figura 20.



**Figura 20.** Iniciadores químicos. i: azobisisobutironitrilo (AIBN); ii: azobisdimetilvaleronitrilo (ABDV); iii: dimetilacetal de benzilo; iv: benzoilperoxido (BPO); v: 4,4'-azo(ácido 4-cianoaléxico).



---

## 8.10. PROCEDIMIENTO GENERAL DE LA POLIMERIZACIÓN

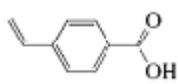
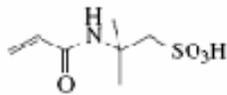
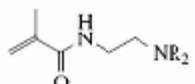
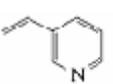
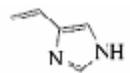
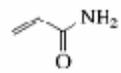
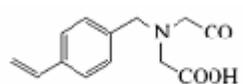
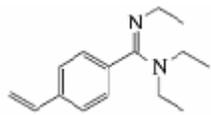
La polimerización por radicales libres de los correspondientes monómeros funcionales es el método principal para la preparación de PMIs. Los ejemplos de compuestos que pueden utilizarse como plantillas son los siguientes<sup>13-14</sup>:

- Compuestos farmacéuticos como antibióticos,  $\beta$ -bloqueadores, anestésicos, opiáceos, etc.
- Aminoácidos
- Hormonas esteroides
- Herbicidas de la serie triazina

Varios monómeros funcionales son utilizados en la síntesis de PMIs (Tabla 2). El ácido metacrílico (MAA), acrilamida (AA), o la 4-vinilpiridina (4-VP) son los frecuentemente utilizados. Hay una regla para la utilización del tipo de monómero funcional a emplear. El MAA se utiliza como monómero funcional en la síntesis de polímeros con impresión molecular de compuestos orgánicos que contienen grupos básicos, como por ejemplo las triazinas.<sup>29-30</sup> Mientras que la 4-VP se utiliza en el caso de tratarse de compuestos que contienen grupos ácidos, tales como el 4-nitrofenol, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y quercetina.<sup>31-32</sup>



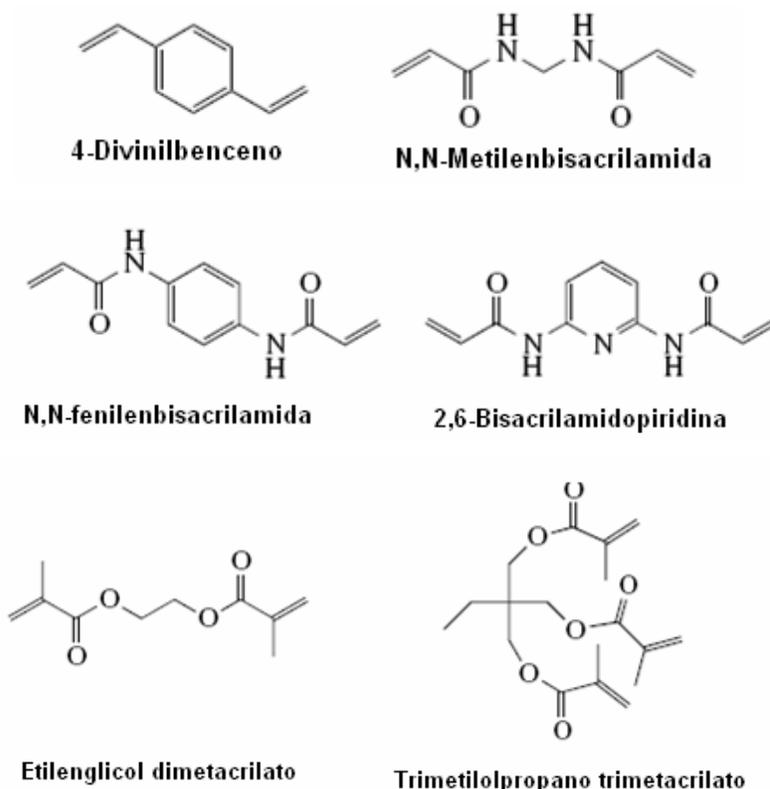
**Tabla 2. Ejemplo de monómeros funcionales utilizados en la síntesis de Polímeros Molecularmente Impresos.**

Monómero funcional	Estructura del monómero	Interacciones monómero-plantilla
Ácidos Acrílicos (R= H, CH <sub>3</sub> , CF <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub> COOH)		ión-ión, puentes de hidrógeno
Ácidos Vinilbenzoicos		ión-ión, puentes de hidrógeno
Ácidos acrilamido sulfónicos		ión-ión
Aminometacrilamidas (R= H <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )		ión-ión
Vinilpiridinas		ión-ión, puentes de hidrógeno, transferencia de carga
Vinilimidazoles		ión-ión, puentes de hidrógeno
Acrilamidas		puentes de hidrógeno
Ácido 4-(vinilbenzil) iminodiacético		ión-ión, puentes de hidrógeno
N,N'-dietil-4-vinilbenzamidina		puentes de hidrógeno



Un prerrequisito importante en la preparación de los PMIs es el empleo de una proporción elevada de agente reticulador respecto a los monómero utilizados, ya que le proporciona la rigidez al polímero. Esto es independiente del tipo de teoría que se utilice para los procedimientos sintéticos (covalente, no covalente o semicovalente). Usualmente, un agente de este tipo se utiliza en una proporción de 1:20 con respecto al monómero funcional obteniendo un rendimiento en la mezcla de reacción de un 70-90%.<sup>33</sup>

Para saber que agente reticulador es el adecuado para utilizar se requiere considerar que sea lo suficientemente soluble en la pre-polymerización de la mezcla de reacción. Los agentes reticuladores o ligantes más comunes se resumen a continuación (figura 21).<sup>34</sup>



**Figura 21.** Ejemplos de agentes reticuladores.



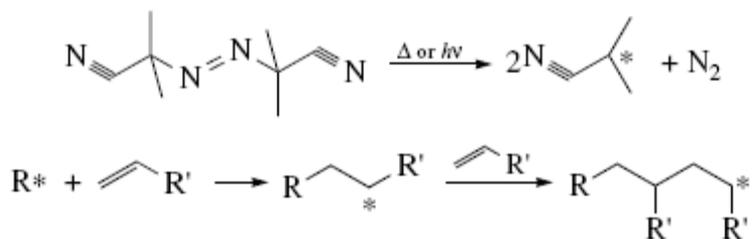
El cambio de agente reticulante depende de la naturaleza del monómero funcional. Así, por ejemplo, isómeros del divinilbenceno se utilizan frecuentemente como agentes reticulantes en la síntesis de PMIs basados en poliestireno, mientras que el dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) se utiliza en la síntesis de PMIs soportados en ácido acrílico o metacrílico.<sup>35</sup>

La cantidad de agente reticulante afecta la rigidez de los PMIs, al mismo tiempo la naturaleza de este agente afecta significativamente las propiedades fisicoquímicas de la matriz polimérica.<sup>36-37</sup>

De este segundo punto se encontró que el EGDMA es el agente reticulador más apropiado, especialmente, para sistemas de ácido metacrílico. No solamente se encontró que los PMIs sintetizados con este agente reticulador son más específicos sino que también presentan buenas propiedades mecánicas, estabilidad térmica, porosidad y humedad.

Frecuentemente, los PMIs se preparan mediante el método de emulsión. La polimerización por radicales libres es inhibida por la presencia de oxígeno; la mezcla de reacción se purga con nitrógeno o argón para remover el oxígeno. La velocidad de polimerización depende de la naturaleza y concentración del iniciador.<sup>38-39</sup>

El azobisisobutironitrilo (AIBN) es el iniciador más eficiente; la ruptura homolítica es clave para formar dos radicales isobutironitrilo con liberación de una molécula de nitrógeno por calentamiento de la mezcla de reacción a 60 °C:





Se observó que la síntesis de PMIs se puede llevar a cabo por disminución de la temperatura (de 15-20 °C) paralelamente iniciando la reacción de polimerización por radiación UV (366 nm).<sup>40 -41</sup>

En este caso, se obtienen PMIs con gran capacidad de reconocimiento molecular. Esto puede explicarse por el hecho de que el complejo de un monómero y la plantilla en la pre-polimerización de la mezcla es más estable a bajas temperaturas.

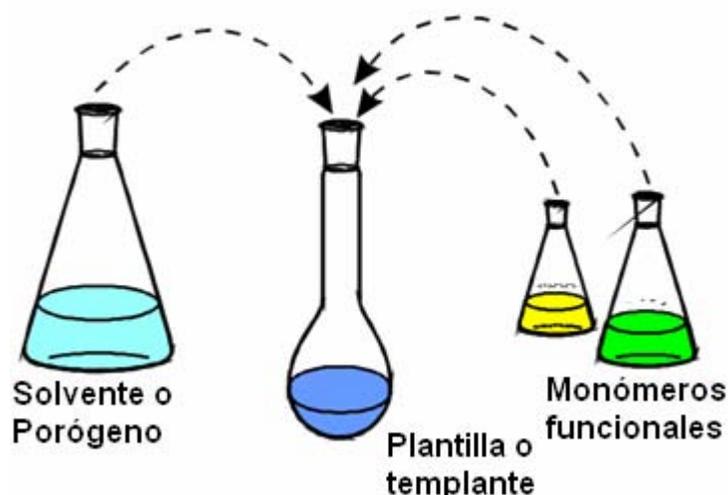
Usualmente, los PMIs se utilizan como un polvo fino (25-50  $\mu\text{m}$ ), el cual se prepara triturando un polímero sintetizado y tamizado sobre mallas moleculares. Además, los PMIs se pueden preparar como partículas esféricas de aproximadamente el mismo tamaño con el uso de polimerización en suspensión o emulsión. Los polímeros con impresión molecular se pueden utilizar como soporte en capa fina sobre una superficie de vidrio para cromatografía en capa fina, como membranas, o como dispositivos sensoriales. Algunas veces, los PMIs son sintetizados inmediatamente por cromatografía en columna o capilar; como resultado, son llamados macroporos o capilares monolíticos, los cuales se han incrementado en el uso de la CLAR o en el área de electroforesis capilar.<sup>42 -43</sup>

Usando la tecnología de impresión molecular estándar, se puede diseñar un material impreso. Por ejemplo, considérese el siguiente sistema:

1. Molécula Molde o Plantilla
2. Monómeros Funcionales
3. Reticulador
4. Disolvente o Porógeno
5. Iniciador



**En el primer paso**, la plantilla se disuelve en el porógeno junto con uno o más monómeros funcionales diferentes que también intervienen en la polimerización. Los monómeros funcionales son unidades químicas polimerizables que presentan grupos funcionales como carboxi, hidroxilo, amino o grupos aromáticos. El monómero funcional seleccionado para la síntesis depende de las características ácidas o básicas de la plantilla. Si los monómeros funcionales son líquidos, normalmente contienen inhibidores que evitan la degradación por lo que es importante eliminarlos antes de iniciar el proceso.

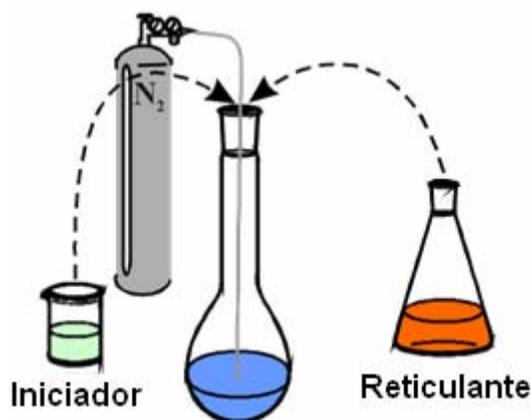


**Figura 22. 1ª etapa del proceso de síntesis de PMIs.**

En esta primera etapa, inicia la pre-polimerización en donde se presentan interacciones entre los diferentes reactivos adicionados (figura 22) formando espontáneamente un complejo cuya estabilidad va a depender del grado de complementariedad en las propiedades químicas de la plantilla con los monómeros funcionales y de las propiedades (por ejemplo, la constante dieléctrica) del disolvente en el cual están disueltos.

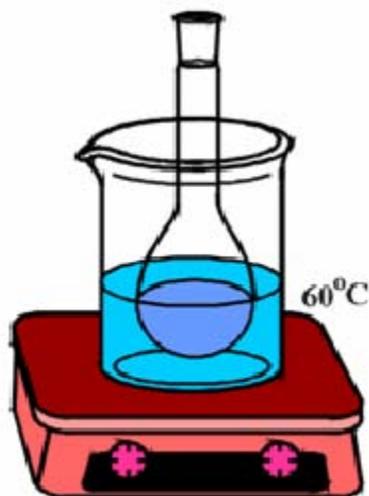


**En el siguiente paso**, se requiere de la adición de una gran cantidad de agente reticulador el cual puede ser de carácter hidrofílico o hidrofóbico junto con el reactivo iniciador como por ejemplo el AIBN. Ya que la polimerización por radicales libres se inhibe por la presencia de oxígeno, la solución normalmente se purga de 5-10 min con un gas inerte como Nitrógeno (figura 23).



**Figura 23. 2ª y 3ª etapa de la preparación de PMIs.**

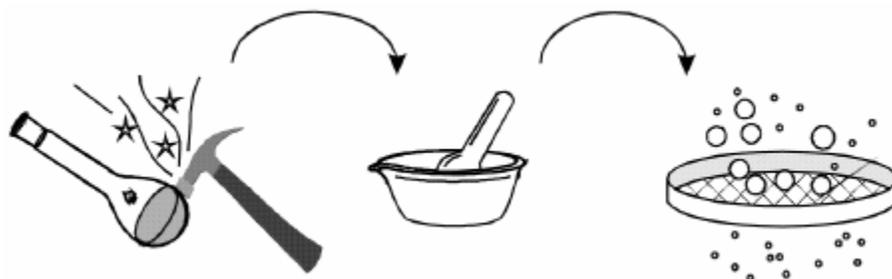
La polimerización se inicia elevando la temperatura a 60°C, o mediante radiación UV a baja temperatura (generalmente de 0-1 °C). Después, comienza la ruptura homolítica del iniciador para originar los radicales libres (figura 24).



**Figura 24. Cuarta etapa: Polimerización.**

La formación del radical inicia la polimerización que conduce a la formación del polímero impreso conteniendo cavidades o “impresiones” que son estéricamente y químicamente complementarias a la plantilla molecular y teóricamente (si el sistema se diseño de manera apropiada) al analito(s) de interés. La formación de enlaces complementarios a las cavidades o sitios de enlace, probablemente dependan factores tales como interacciones durante la etapa de formación del pre-complejo, algún rearrreglo de monómeros alrededor de la plantilla o complejos de la misma durante el proceso de polimerización y partición influenciada por el disolvente o porógeno.<sup>44</sup>

A continuación, para poder empacar el polímero como adsorbente en la EFS, el polímero se tritura y se tamiza para obtener partículas de tamaño adecuado, normalmente de tamaño de partícula de 10-25  $\mu\text{m}$  (figura 25).



**Figura 25. Etapa de trituración y tamizado.**

Antes de que se utilice el PMI en algún estudio de reenlazamiento, hay un paso fundamental previo, extracción de la plantilla molecular de la matriz polimérica. Para ello, se han desarrollado un número considerable de protocolos de extracción aplicables a diferentes procedimientos de impresión (figura 26).



**Figura 26. Etapa de extracción.**

Finalmente, después del secado, el PMI está listo para su uso!

Normalmente, de forma simultánea a la síntesis de PMIs, se prepara un blanco, es decir, el mismo procedimiento sin la plantilla molecular denominada Polímero No Impreso (PNI). Esto permite evaluar la funcionalidad de los PMIs ya que éste podrá retener el analito, contrario a lo que haría el PNI. De esta manera se puede comparar la estructura entre uno y otro y evaluar el efecto impreso del PMIs.

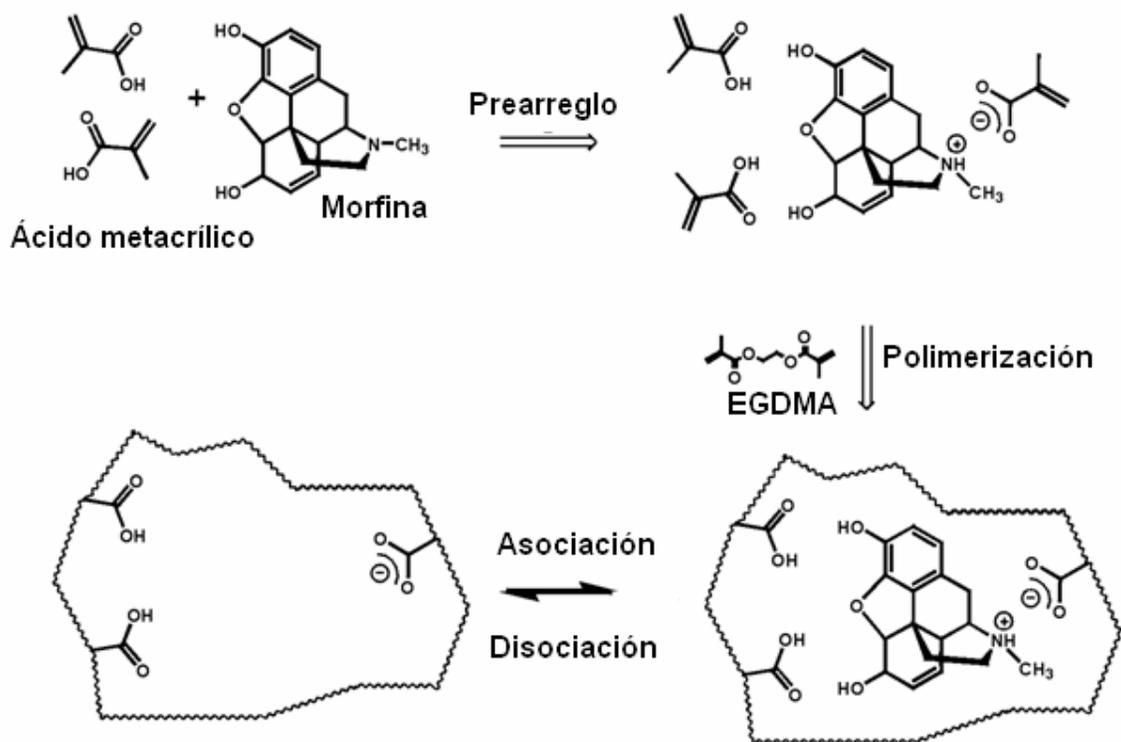


La selección de la plantilla y de los monómeros son dos de las características más críticas para el diseño de una buena estrategia de síntesis en los procesos de la impresión molecular. Para aplicaciones analíticas existe una regla fundamental a seguir llamada “regla de 6”.<sup>24</sup> Esta regla consiste en:

1. Nunca utilizar el analito como plantilla a menos que no haya otra alternativa
2. Hacer cambios lógicos respecto a qué regiones de un analito son adecuadas para dirigir los mejores tipos de interacciones en un medio de baja constante dieléctrica (disolvente orgánico) y entonces incorporar los elementos en un análogo de la molécula del analito.
3. Seleccionar los monómeros que tengan mayor probabilidad de interactuar con el disolvente elegido (por ejemplo, ácidos de Bronsted-Lowry o bases/donadores de H o aceptores/grupos no polares, etc.) de tal forma que se pueda incrementar la capacidad y homogeneidad en los sitios de enlace.
4. Elegir plantillas y monómeros que sean solubles en el medio en donde se llevará a cabo el proceso de polimerización. Esto parecería obvio pero en ocasiones es preferible realizar pruebas de solubilidad.
5. Garantizar, como sea posible, que la mezcla plantilla-monomero permanezca estable y no sufra reacciones secundarias bajo las condiciones secundarias.
6. Considerar la naturaleza de la matriz de la cual el analito va a extraer para seleccionar el monómero adecuado como por ejemplo, vinílicos, acrílico, metacrílico, acrilamida, etc.



Un ejemplo de un diseño utilizado en la impresión molecular basado en interacciones no covalentes se presenta en la figura 27. En este ejemplo, una matriz molecularmente impresa con una plantilla de morfina se prepara usando ácido metacrílico como monómero funcional, capaz de generar enlaces no covalentes con la plantilla molecular en solución, previo a la polimerización. A continuación, se lleva a cabo la copolimerización de esos complejos en solución con un agente reticulador, el dimetacrilato de etilenglicol, y después se remueve el la plantilla molecular mediante una simple extracción con algún disolvente, obteniendo así, los sitios de reconocimiento generalmente complementarios en forma y funcionalidad a las especies impresas. La asociación/disociación de la plantilla molecular puede ocurrir mediante un método de difusión dentro o fuera de esos sitios.<sup>14</sup>



**Figura 27.** Impresión no covalente de morfina.



## 8.11. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO

Los polímeros macroscópicos reticulares son notoriamente difíciles de caracterizar, en gran parte debido a su naturaleza insoluble y complicada en su manejo. Los polímeros impresos no son la excepción. Es posible cierto grado de caracterización, sin embargo, uno puede distinguir entre tres niveles de caracterización: (1) caracterización morfológica, (2) caracterización química, y (3) caracterización del comportamiento en el reconocimiento molecular.

### 8.11.1. La Caracterización Morfológica

Dependiendo del método de análisis, la información útil se puede recopilar de los volúmenes de los poros específicos, tamaño de los poros, distribución de tamaño de los poros y áreas superficiales específicas de los materiales. Los métodos analíticos idóneos incluyen:

1. Los experimentos que incluyen disolventes.

Los macroporos poliméricos son permanentemente porosos aún en seco y el disolvente se puede utilizar para penetrar la red del poro. Midiendo la cantidad de disolvente utilizado por un polímero se puede realizar un estimado del volumen específico del poro (mL/g).

2. La Porosimetría de Adsorción de Nitrógeno

Involucra cierta masa seca del polímero existente expuesto a un gas (usualmente Nitrógeno) a una serie de presiones determinadas.



Midiendo la cantidad de gas adsorbido en función de la presión, la adsorción isotérmica se puede construir siguiendo las aplicaciones teóricas y modelos matemáticos, la información del área superficial específica ( $\text{m}^2/\text{g}$ ), el volumen específico del poro ( $\text{mL}/\text{g}$ ), el promedio del diámetro del poro, pudiendo así, determinar la distribución del tamaño del poro. El método es particularmente útil en el análisis detallado de la medición de tamaños de poro mediano y pequeño. La IUPAC define el concepto de poro en términos de tamaño: Macroporos, menos de 2 nm, mesoporos, entre 2 y 50 nm y macroporos, mayor de 50 nm.

### 3. La Porosimetría por Intrusión de Mercurio

Implica la presencia de mercurio generando presión en una cierta cantidad de masa seca del polímero. La información que puede generarse de tales experimentos es similar a la que se pueden obtener con experimentos realizados por porosimetría de adsorción con Nitrógeno, aunque este es generalmente más sensible en pruebas con poros muchos más grandes (macro).

### 4. La Cromatografía de Tamaño de Exclusión Inversa

La estructura de los poros de los polímeros se puede determinar en estado húmedo por este método. Esto es, quizá, significativo en los polímeros impresos involucrados, porque encuentran aplicaciones que generalmente, no encontraban en el estado húmedo. De las aplicaciones de los modelos matemáticos idóneos, se puede obtener la información de la estructura del poro del polímero de la fase estacionaria. En muchos casos esta técnica se puede ver como una técnica complementaria de la porosimetría de adsorción con nitrógeno y la porosimetría de intrusión de mercurio, con la ventaja de que puede realizarse en estado húmedo.



## 5. La Microscopía

Se puede utilizar en una gran variedad de rutas para determinar los polímeros impresos en una gran variedad de escalas. Por ejemplo, la microscopía de luz se puede utilizar para verificar la integridad de la estructura en la emulsión del polímero mientras que la microscopía electrónica de barrido puede a menudo utilizarse para obtener imágenes de los macroporos.

### 8.11.2. La Caracterización Química

Dada su naturaleza insoluble e intratable, los polímeros impresos, generalmente no se pueden caracterizar por métodos que involucran una muestra en solución como por ejemplo la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los métodos convenientes que se pueden utilizar en muestras en estado sólido incluyen:

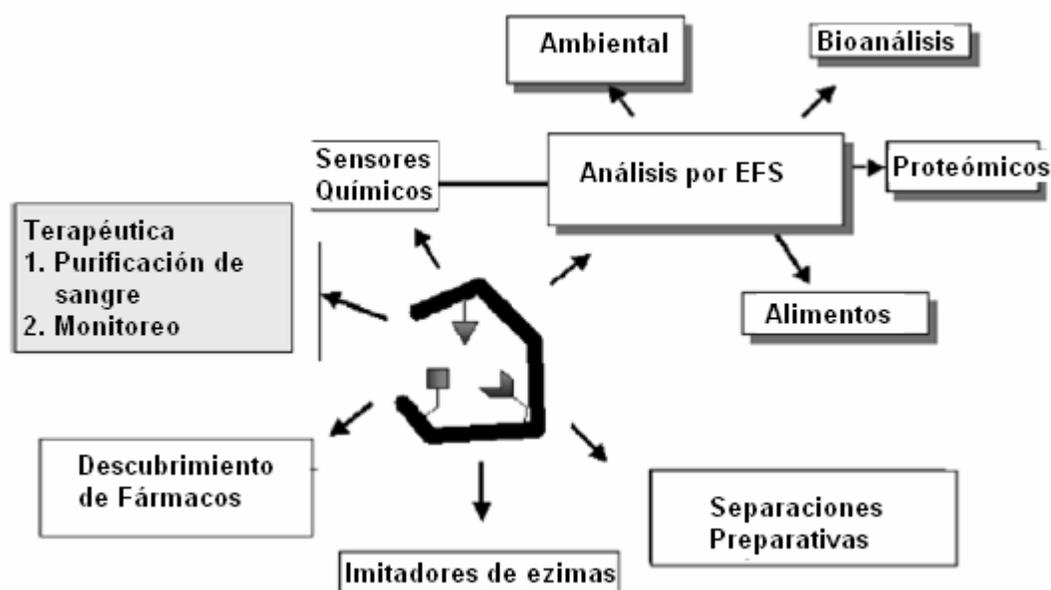
1. Análisis Microelemental
2. Espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier
3. Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido.



## 8.12. APLICACIONES

De todos aquellos procesos que hay en la naturaleza, las investigaciones en el campo del reconocimiento molecular han surgido de manera importante, encontrando en este rubro una gran aplicación (figura 28) para matrices impresas como:

- Separaciones y aislamiento
  - Separaciones quirales de derivados de aminoácidos<sup>45,46</sup>
  - Separaciones selectivas sobre sustrato<sup>47</sup>
- Análisis de inmunoensayo como imitadores de anticuerpos y receptores<sup>48</sup>
  - Ensayos de enlazamiento a ligandos competitivos
  - Aplicaciones de diagnóstico
- Aplicaciones catalíticas actuando como enzimas<sup>49</sup>
- Biosensores<sup>50</sup>



**Figura 28.** Principales áreas de aplicación de los PMIs.



La impresión molecular es una tecnología genérica y puede tener varias aplicaciones en diferentes áreas como:

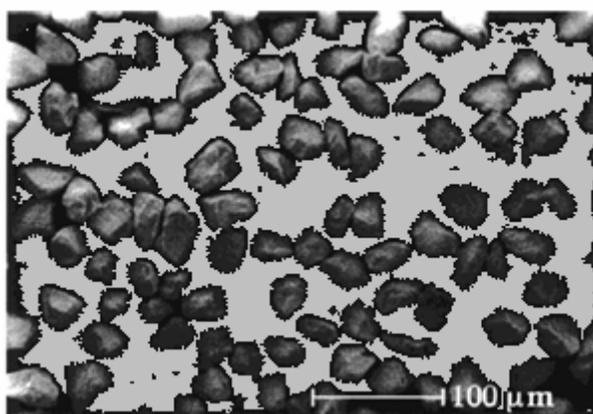
- Cromatografía
- Extracción en Fase Sólida (EFS)<sup>51</sup>
- Membranas selectivas permeables
- Elaboración de matrices de fármaco/fragancia
- Adsorbentes para aplicaciones clínicas y en el medio ambiente
- Sensores y multisensores para medio ambiente, diagnóstico clínico y medio ambiente extremo
- Reemplazo de procesos químicos, químicos comunes, industriales o diferentes para catálisis con PMIs.

El uso de drogas de abuso se ha incrementado dramáticamente en las últimas tres décadas. La técnica más popular utilizada para la detección de drogas de abuso son la extracción líquido-líquido o la Extracción en Fase Sólida seguido de una medición por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. Aunque ésta técnica ofrece la posibilidad de identificar varios compuestos de manera simultánea, el problema se presenta en la técnica de detección de la cromatografía de gases-masas, ya que el equipo resulta demasiado costoso. Además, la etapa de derivatización se dificulta con algunos compuestos. Otros métodos analíticos empleados son el inmunoensayo, cromatografía en capa fina, espectroscopia de Raman, espectroscopia de fluorescencia y cromatografía líquida acoplada a detectores electroquímicos.

A pesar de que se cuenta con una variedad de métodos analíticos para la identificación de drogas de abuso, aun se requiere del desarrollo de dispositivos portátiles multisensoriales los cuales permiten un análisis rápido y efectivo de un amplio rango de moléculas blanco. Entre los requerimientos para la detección de drogas están la simplicidad para la recolección de la muestra, la preparación de la muestra de manera rápida y fácil, bajo costo y un incremento en la velocidad de la prueba.



Algunas de las investigaciones relevantes en el ámbito forense han sido, por ejemplo, el uso de la técnica de impresión molecular para la síntesis de PMIs de benzodiazepinas para poder diferenciar enantiómeros de estos compuestos. El trabajo reportado por Shea, K. y col.<sup>52</sup>, en el 2000 hace mención de la preparación y obtención de los PMIs. Estos son lavados, extraídos con metanol, triturados y tamizados para obtener un tamaño de partícula que va de los 25-38  $\mu\text{m}$  como se muestra en la figura 29. Después, las partículas se empacan en una columna cromatográfica de acero de 10 cm X 0,46 cm para su posterior evaluación.



**Figura 29.** PMIs de Benzodiazepinas.

En el análisis detallado de la CLAR para evaluar las propiedades de enlazamiento de estos PMIs revela una dependencia significativa de la relación quiral con la forma de los sitios de enlace impreso. Estos resultados demuestran la capacidad de los PMIs de diferenciar las moléculas enantioméricas, favoreciendo la configuración absoluta impresa.

Estos datos indican que los receptores sintéticos de benzodiazepinas pueden ser viables como imitadores iniciales de un receptor natural. Al mismo tiempo, los PMIs utilizados como receptores sintéticos de drogas de abuso pueden no ser imitadores de proteínas naturales pero pueden ser útiles como referencia entre una gran cantidad de compuestos con propiedades similares y afinidades relacionadas. Ya que la estructura molecular es clave para la reactividad, es



posible que los PMIs se puedan clasificar de acuerdo al tipo de fármacos a los cuales están dirigidos.<sup>52</sup>

Los PMIs para penicilina V u oxacilina son otro ejemplo de aplicación, que si bien no es directamente en el área forense, es importante mencionarlo puesto que son fármacos al igual que los compuestos involucrados en los exámenes toxicológicos. Skudar y col.<sup>53</sup>, reportaron la preparación de estos y sus propiedades de reconocimiento tanto en fase orgánica como en soluciones acuosas. Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de diferenciación entre las distintas penicilinas: penicilina V, penicilina G y oxacilina.

En este mismo rubro se han sintetizado PMIs para bloqueadores  $\beta$ -bloqueadores tales como el (S)-timolol y (S)-propranolol, estimulantes  $\beta$ -adrenérgicos como la efedrina y pseudoefedrina, los cuales poseen dos centros estereogénicos, pudiendo reconocer selectivamente los correspondientes diastereómeros, y muestran una selectividad moderada por la epinefrina y varios bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, los cuales son estructuralmente relacionados a los estimulantes  $\beta$ -adrenérgicos.<sup>46</sup>

En los últimos años, se han desarrollado receptores sintéticos de estimulantes del sistema nervioso central como cocaína y deoxiefedrina y opioides como morfina y metadona, dos de los grupos más importantes de las drogas de abuso. Se han tratado de obtener materiales estables y sensibles los cuales no solamente puedan tener alta afinidad y especificidad sino también puedan ser compatibles con disolventes orgánicos y estables a altas temperaturas para poder utilizarse como sustitutos de elementos biológicos de reconocimiento. Piletska y col.<sup>54</sup>, diseñaron y sintetizaron en receptores sintéticos de cocaína comparándolos con aquellos de origen natural. Se encontró que los PMIs sintetizados poseen fuerte afinidad y especificidad por los sitios de enlace para cada molécula que fue sintetizada. Los receptores sintetizados se evaluaron, encontrando una alta selectividad y afinidad por sus correspondientes plantillas.

### **8.13. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)**



La extracción en fase sólida (EFS) se está convirtiendo en el sistema ideal para la preparación de muestras antes del análisis por CLAR, CG, radioinmunoensayo (RIME), RMN, y otras técnicas instrumentales analíticas. Sus principales objetivos son la limpieza de la muestra (*“Clean-up”*), la concentración del analito en ésta y la posibilidad de cambio de disolvente (por ejemplo, de acuosos a orgánico).

Se basa en el mismo principio de retención selectiva que la cromatografía líquida, es decir, en la diferente afinidad que presenta el analito (o la matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida (o el extracto obtenido). De esta manera, al hacer pasar una muestra por una fase sólida (polar, apolar, intercambio iónico, etc.), algunos compuestos quedan retenidos en ella mientras que otros pasan inalterados. Posteriormente, si los analitos de interés quedan retenidos, éstos se eluyen con un pequeño volumen de disolvente. La forma habitual de trabajo es la extracción, donde la fase sólida (adsorbente) está colocada en un cartucho de vidrio o de polietileno (similar al cuerpo de una jeringa). Hay una gran variedad de cartuchos que se diferencian en el tipo de fase, la capacidad y la cantidad que contienen, que deben seleccionarse en función del tipo de analito, de su concentración y del disolvente en que se encuentre

La EFS ofrece muchos beneficios y ventajas sobre las técnicas tradicionales de preparación de muestras, entre ellos:

- Altas recuperaciones de los analitos
- Posibilidad de eliminación de interferencias
- Posibilidad de concentración de los analitos
- Capacidad de extraer analitos de amplio rango de polaridad simultáneamente
- Fácil automatización
- Compatibilidad con instrumentos de análisis
- Reducción del consumo de disolventes orgánicos

Los pasos de la EFS son en cuatro etapas (figura 30):



### 1. Acondicionamiento.

Debe prepararse la fase antes de aplicar la muestra para obtener una interacción reproducible. Esto se consigue solvatando la fase. Se pasa un volumen de disolvente adecuado a través de la fase, seguido de un volumen de líquido similar a la matriz de la muestra.

### 2/3. Aplicación y Retención

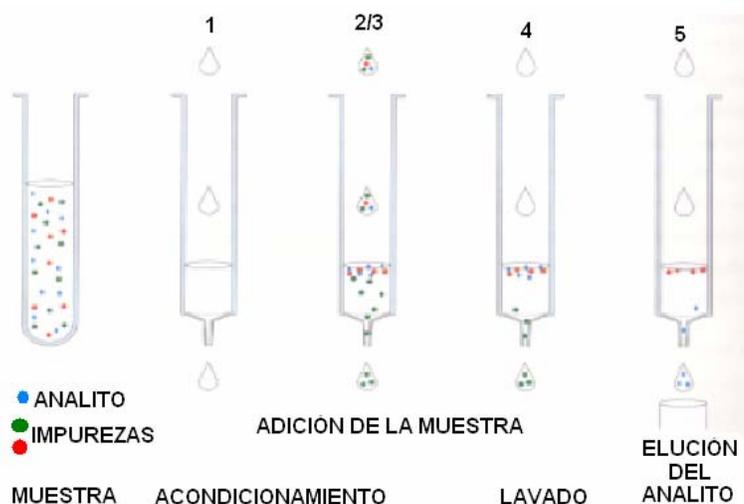
Una vez aplicada la muestra, el analito y otros componentes de la matriz quedan retenidos en la fase debido a una o varias interacciones químicas. Otros componentes de la matriz pueden pasar a través de la fase sin ser retenidos.

### 4. Lavado

Esta fase debe conseguir que se eluyan los componentes de la matriz no deseados que hayan quedado retenidos en la fase durante la etapa de retención.

### 5. Elución

Debe elegirse un disolvente de elución capaz de romper solamente la interacción entre el analito y la fase, obteniendo así una elución selectiva.



**Figura 30.** Procedimiento de la Extracción en Fase Sólida.



---

#### **8.14. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON POLIMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS (PMIEFS)**

La extracción en fase sólida (EFS) ha aparecido como una alternativa a la extracción líquido-líquido debido a la simplicidad de la técnica, bajo costo y fácil automatización acoplándose a cromatografía de gases o líquidos.

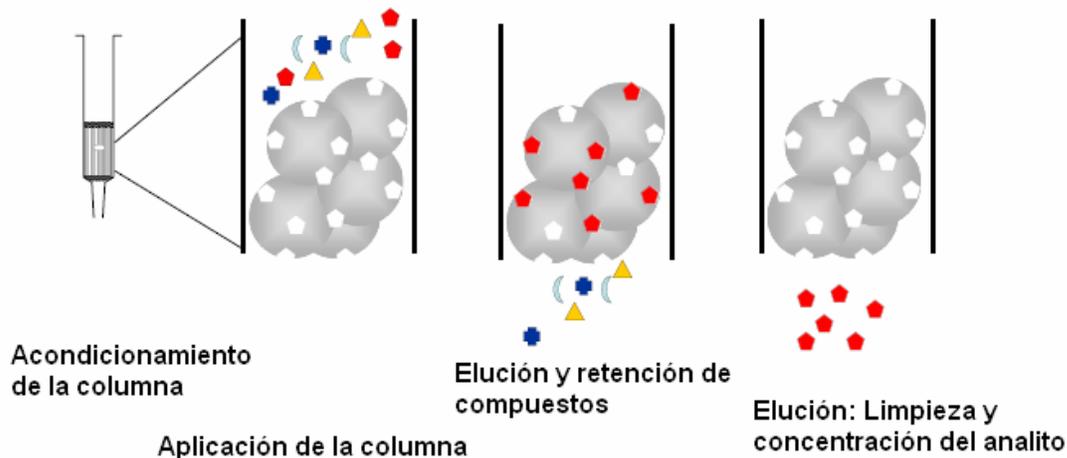
De forma general, el procedimiento de EFS se suele llevar a cabo en el modo fuera de línea, aunque se han descrito diversos acoplamientos con técnicas cromatográficas y no cromatográficas. La idea de acoplar este sistema de extracción en línea con otra técnica de separación/determinación da lugar a una buena herramienta en la automatización del proceso analítico.

El acoplamiento EFS-CLAR se lleva a cabo a través de una pre-columna rellena con el adsorbente adecuado, insertada en el bucle de una válvula de inyección de seis vías, de forma que las etapas de activación, paso de la muestra y lavado pueden hacerse de forma automatizada y, a la vez, independiente del sistema cromatográfico. Cuando se eluyen los analitos, el inyector se coloca en una posición que permite la introducción de los analitos con bajas pérdidas así como con una baja contaminación de la muestra.

A la fecha, varios adsorbentes con diferentes propiedades están disponibles comercialmente, sin embargo, estos no son lo suficientemente selectivos y por lo tanto, el analito es retenido junto con otros compuestos de la matriz lo cual impide la determinación final del mismo por técnicas cromatográficas. Por lo tanto, el uso de PMIs en esta área ha adquirido una importancia relevante. Como en otros procedimientos de EFS, una pequeña cantidad de PMIs, generalmente de 50-200 mg es empacada en un pequeño cartucho. Después, los pasos comunes de acondicionamiento, retención de la muestra, lavado y elución se llevan a cabo (figura 31).



Sin embargo, en la Extracción en Fase sólida con Polímeros Molecularmente Impresos (EFSPMI), la selección de los disolventes depende de las pequeñas interacciones monómero-plantilla que toman lugar durante la polimerización y sobre el porógeno utilizado. Ya que las interacciones plantilla-monómero son de tipo puente de hidrógeno, se cambia el disolvente utilizado para estabilizar estas interacciones permitiendo el reenlazamiento del analito a los sitios específicos de enlace, mientras que el disolvente de elución puede optimizarse considerando su capacidad de perturbación de los enlaces formados.



**Figura 31.** Procedimiento de Extracción en Fase Sólida con PMIs.

#### 8.14.1. Aplicación y Retención de la Muestra

El reenlazamiento de plantilla con los polímeros impresos, mediante puentes de hidrógeno, se lleva a cabo empleando el mismo disolvente durante la polimerización y por consecuencia, la posterior retención del analito disminuye cuando se incrementa la polaridad del disolvente. Por ejemplo, se ha reportado que los polímeros preparados en tolueno como disolvente, muestran mejor reconocimiento cuando la aplicación de la muestra se lleva a cabo con este que cuando se emplea acetonitrilo (un disolvente más polar). Sin embargo, también se ha reportado que, si el polímero se ha preparado en acetonitrilo, la recuperación del polímero disminuye cuando se utiliza cloroformo (un disolvente menos polar) que cuando se utiliza acetonitrilo como disolvente de aplicación.



Aunque estos consejos se pueden considerar como regla general, el disolvente apropiado para la aplicación de la muestra dependerá de las propiedades de ésta de tal manera que se eviten las interacciones no específicas. Por ejemplo, la retención del clenbuterol en un polímero blanco (preparado sin una plantilla) y en un polímero impreso, ambos preparados en acetonitrilo, fue completa cuando se empleo acetonitrilo para aplicar la muestra debido a interacciones no específicas entre el clenbuterol y la matriz polimérica. Sin embargo, adicionando 1% de ácido acético al acetonitrilo (mezcla capaz de perturbar los enlaces de hidrógeno) el enlace disminuye a un 33% en el polímero blanco, mientras que esta permanece por completo en el polímero impreso.<sup>55</sup>

Como se ha mencionado, los polímeros se preparan en disolventes apróticos y estos no permiten la aplicación directa de las muestras de medios acuosos y así evitar la EFSPMI de analitos de medios acuosos y fluidos biológicos; sin embargo, en muchos casos esto si es posible si los polímeros interactúan con los analitos mediante fuerzas hidrofóbicas. Matsui y col., en 1997, aplicaron 500 mL de muestra acuosa con varios herbicidas (Simazina, Asulam, Tiram, Iprodina y Propizamida) sobre un polímero impreso de triazina. Todos los herbicidas evaluados se retienen cuantitativamente en la matriz polimérica mediante interacciones hidrofóbicas. Después, el polímero se lavó con diclorometano (DCM) logrando el enlazamiento selectivo de la simazina al adsorbente, mientras que los herbicidas se eluyen del cartucho.



### 8.14.2. Lavado

Este paso se realiza para maximizar las interacciones específicas entre los analitos y los PMIs con la elución simultánea del resto de los compuestos retenidos en la matriz polimérica. Normalmente, el disolvente empleado en esta etapa es el mismo que el utilizado en la aplicación de la muestra; sin embargo, cuando las interacciones no específicas son importantes, es necesario aumentar la polaridad del disolvente para hacer una distinción clara entre los enlaces específicos del analito en la cavidad preformada y las interacciones no específicas con la matriz polimérica.<sup>56-57</sup>

### 8.14.3. Elución

Los analitos, generalmente, son eluidos con disolventes polares (MeCN) y próticos (MeOH) y mezclas de ambos, incluyendo en muchos casos de trazas de ácidos débiles (ácido acético) y bases (trietilamina). En esta ruta, las interacciones monómero-plantilla basadas en puentes de hidrógeno son perturbadas y los analitos son liberados del polímero. Se ha reportado que los PMIs pueden sufrir grandes cambios en el volumen debido al cambio del disolvente durante la prueba. Esto puede causar aumento o disminución de los polímeros, conduciendo a cambios en el sitio de reconocimiento.<sup>58</sup>

Al respecto, Zander y col.<sup>59</sup>, en 1998, reportaron una disminución en la recuperación del 100% a menos del 50% en una EFSPMI de nicotina de un polímero impreso con el mismo compuesto cuando la cantidad de agua presente en el disolvente de elución se incremento de un 2.5 a un 30%. Esto puede indicar, de acuerdo a esos autores, que el analito es atrapado en los pequeños poros del polímero. Así, **como regla general**, los recobros cuantitativos se pueden obtener usando un disolvente de elución basado en acetonitrilo o metanol con pequeñas cantidades (de 1-10%) de ácido acético, ácido trifluoroacético, trietilamina o compuestos similares, permitiendo la perturbación de puentes de hidrógeno sin un impacto mayor en la morfología del polímero.



Otro problema asociado con el paso de elución esta relacionado con los restos de plantilla no removidos de la matriz polimérica. Hasta ahora, ha sido difícil de remover toda la plantilla y cierta cantidad que se pierde, se detecta durante el paso de elución, lo cual es claramente una fuente de error en el análisis de trazas. Como se ha explicado claramente por Rashid y col.<sup>56</sup>, en 1997, si en un análisis se puede detectar la molécula de una plantilla hasta por debajo de 50 ng/mL, entonces hasta un 0.00001% de la plantilla molecular puede producir interferencia significativa, lo cual es una aproximación muy real, tomando en cuenta la alta cantidad de plantilla utilizada durante la polimerización. Varias propuestas se han realizado para contrarrestar este inconveniente, incluyendo lavados exhaustivos previos a su uso, lo cual puede afectar la morfología del polímero, calentando el polímero, extracción paralela de soluciones blanco, asumiendo fuga reproducible entre cartuchos, y usando una estructura análoga para el analito como una plantilla molecular. Al respecto, Matsui y col.<sup>60</sup>, en el 2000, prepararon el polímero impreso de una dibutilamina como un adsorbente selectivo del herbicida triazina. Puesto que la dibutilamina no se emplea en la agricultura, aun si hay remanentes en el polímero no posibilitan interrupción en el análisis de triazina.

#### **8.14.4. Formas de Aplicación**

En los últimos 5 años se incrementado el número de publicaciones respecto a la optimización de la preparación de polímeros y procedimientos de EFS. Aunque pocos de los procedimientos desarrollados han sido aplicados en la extracción de analitos de reconocimiento de muestras reales, es posible diferenciar tres tipos de procedimientos básicos:

1. Protocolos Fuera de línea
2. EFSPMI con Elución Pulsada
3. EFSPMI en línea acoplado a cromatografía de líquidos.



### 1. Protocolos Fuera de Línea

Puesto que el método fuera de línea no difiere de un procedimiento típico de EFS, esto involucra la aplicación de la muestra sobre el adsorbente, usualmente colocado en un cartucho lavado para descartar algún otro tipo de compuestos, elución de los analitos y la determinación final mediante técnicas cromatográficas.

### 2. EFSPMI con Elución Pulsada

Este método fue introducido por Mullet y Lai<sup>60</sup> en 1998 y, aunque se puede considerar como un protocolo en línea, las características particulares ameritan un apartado independiente. La EFSPMI con elución pulsada esta basada en el uso de una pequeña cantidad de volumen de disolvente (20 $\mu$ L) para eluir el analito (elución pulsada) retenido en el polímero impreso empacado dentro de la columna directamente conectado al sistema de detección.

### 3. EFSPMI en línea acoplado a cromatografía de líquidos.

En este formato, una pequeña pre-columna (típicamente 1cm x 4.6 mm de diámetro interno) empacada con el polímero impreso es colocada en la válvula inyección. Después de la pre-concentración de la muestra y el lavado para descartar contaminantes, los analitos se eluyen con la fase móvil y separados en la columna analítica. Esta propuesta es especialmente apropiada para determinar multianalitos usando polímeros impresos capaces de reconocer varios compuestos estructuralmente relacionados.



---

## 9. DISCUSIÓN

A pesar de que los PMIs poseen ya una gama de aplicaciones, la extracción en fase sólida, para la cual son comercializados, se requieren más trabajos para hacer de ellos una alternativa real o complemento de moléculas del ámbito forense, entre otras. En particular, podría esperarse alcanzar un desarrollo de PMIs que abarquen una mayor cantidad de moléculas blanco y que se puedan preparar de forma rutinaria en disolventes orgánicos y acuosos. Las propiedades que presentan los PMIs tales como estabilidad, bajo costo y fácil integración en los procesos de producción industrial pueden hacer de ellos una alternativa atractiva para que se puedan sintetizar una amplia gama de moléculas relacionadas con las drogas de abuso. En consecuencia, los métodos combinatorios o computacionales pueden ser una opción en el diseño para la síntesis de plantillas de las distintas Drogas de Abuso y así obtener polímeros óptimos para el análisis de las mismas.

El desarrollo de nuevos materiales sintéticos robustos para drogas controladas reportadas en esta revisión pueden beneficiar a las áreas analítica, de salud y por supuesto a la que no interesa como lo es la forense.

Así, se ha descrito toda una monografía relacionada a los PMIs con la única finalidad de dar a conocer su aplicación en diferentes campos y ofrecer una opción para el ámbito forense que si bien aún no se aplica de manera real, existe un alto grado de posibilidades para ello.

En México se realiza investigación sobre este tipo de compuestos; Sin embargo no hay algo claro referente a compuestos relacionados directamente a las drogas de abuso lo cual lo hace aún más interesante por explorar.



---

## 10. CONCLUSIONES

1. Se propone el uso de los PMIs como un material ideal para la preparación de muestras para que se excluya el paso de preparación de muestras completamente y así únicamente “diluir y aplicar”.
2. La tecnología de la impresión molecular brinda una opción en el tratamiento de muestras biológicas y/o matrices complejas que contienen drogas de abuso como cocaína, morfina, metanfetaminas, etc. mediante el empleo de los PMIs con la finalidad reducir el tiempo, costo del análisis cualitativo y cuantitativo de tales drogas, ya que permitiría su extracción y purificación mucho más rápido.
3. La técnica de extracción en fase sólida con polímeros molecularmente impresos (PMIEFS) puede acoplarse a un sistema de cromatografía de alta resolución (CLAR) empleando los PMIs en cartuchos pequeños que funcionarían como una pre-columna.
4. La Tecnología de Impresión Molecular ofrece un amplio campo de investigación para poder llegar a obtener materiales sintéticos de las principales Drogas de Abuso y con ello reducir tiempo y costos de exámenes toxicológicos pero sobre todo permitir una mayor confiabilidad en el análisis.



---

## 11. ABREVIATURAS

**PMIs:** Polímeros Molecularmente Impresos.

**MIPs:** Molecular Imprinted Polymers.

**CLAR:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

**UV:** Ultravioleta.

**EQ:** Electroquímico.

**FL:** Fluorescencia.

**EM:** Espectrometría de Masas.

**CG:** Cromatografía de gases.

**CL-EM:** Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas.

**CG-EM:** Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.

**EFS:** Extracción en Fase Sólida.

**MDA:** Metilendioxiamfetamina.

**MDMA:** Metilendioximetilamfetamina.

**MDEA:** Metilendioxietilamfetamina.

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.

**CCF:** Cromatografía en Capa Fina.

**AIBN:** Azobisisobutironitrilo.

**EGDMA:** Dimetilacrilato de Etilenglicol.

**PNI:** Polímero No Impreso.

**IUPAC:** Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

**EFS-CLAR:** Extracción en Fase Sólida acoplado a Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

**EFSPMI:** Extracción en Fase Sólida con Polímeros Molecularmente Impresos.

**MeOH:** Metanol.

**DCM:** Diclorometano.

**MeCN:** Acetonitrilo.



---

## 12. GLOSARIO

### **Impresión Molecular**

Técnica utilizada para la síntesis de polímeros orgánicos o inorgánicos capaces de reconocer moléculas utilizadas durante su síntesis denominadas plantillas moleculares.

### **Polímeros Molecularmente Impresos**

Polímeros sintéticos con determinada selectividad predeterminada para una molécula en particular o un grupo estructuralmente relacionado de moléculas.

### **Reticulador o Cruzador**

Unidad con dos o más sitios de unión para los monómeros funcionales.

### **Monómero Funcional**

Entidad polimerizable la cual interactúa con la plantilla o molécula impresa.

### **Plantilla Molecular o Molécula Impresa**

Molécula molde seleccionada para el procedimiento de impresión molecular.

### **Iniciador**

Sustancia que inicia el proceso de polimerización.

### **Porógeno**

Disolvente encargado de inducir la porosidad en los Polímeros Molecularmente Impresos.

### **Fármaco**

Sustancia natural o sintética que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.



---

## **Droga**

Agente o sustancia química empleada en el tratamiento, curación, profilaxis o diagnóstico de las enfermedades, incluyendo las drogas de abuso que, aunque algunas tienen propiedades terapéuticas, por la dependencia que generan no son viables para su uso terapéutico.

### **Droga de Abuso**

Toda sustancia que produce dependencia y que se emplea voluntariamente para provocarse determinadas sensaciones o estados síquicos no justificados terapéuticamente.

### **Droga de Diseño**

Psicofármaco sintético producido de forma clandestina, que semeja algunas drogas legales o lícitas de amplio consumo, y que puede generar amplia demanda. Derivado de la amfetamina.

### **Prueba Presuntiva**

Prueba preliminar para la identificación de drogas de abuso que sirve de base para elegir la prueba confirmatoria a utilizar.

### **Psicotrópico**

Del griego *psyche*, "mente" y *tropein*, "tornar". Es un agente químico que actúa sobre el sistema nervioso central, lo cual trae como consecuencia cambios temporales en la percepción, ánimo, estado de conciencia y comportamiento.

Sustancia que genera una serie de alteraciones sobre el Sistema Nervio Central.



---

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lorenzo, P.; Laredo, J. Drogodependencias. Médica Panamericana, Madrid, **1998**:21.
2. Ruiz, L. Drogas de Diseño. Revista Cómo Ves, publicaciones UNAM. **2002**, 4 (46):10-14.
3. Andersson, L.; Ekberg, B.; Mosbach, K. *Molecular Interactions in Bioseparations*. **1993**: 383-395.
4. Piletska, E., Romero-Guerra, M. y Piletsky, S. *Analytica Chimica Acta*. **2005**, 542: 111-117.
5. Rendle, D. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34: 1021-1030.
6. Sallergren, B y Allender, C. *Avanced Drug Delivery Reviews*. **2005**, 57: 1733- 1741.
7. Bergmann, N. y Peppas, N. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 33: 271-288.
8. Wulff, G. y Sarhan, A. *Angew. Chem.* **1972**, 84: 364.
9. Arshday, R. y Mosbach, K. *Makromol. Chem.* **1981**, 182: 687-692.
10. Piletsky, S., Alcock, S. y Turner, A. *Trends in Biotechnology*. **2001**, 19,1: 9-12.
11. Kempe, M. y Mosbach, K. *J. Chromatogr.* **1994**, 664: 276-279.
12. Fischer, L., Muller, R., Ekberg, B. y Mosbach. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113: 9358-9360.
13. Vlatakis, G., Andersson, L., Muller, R. y Mosbach, K. *Nature*. **1993**, 361: 645- 647.
14. Andersson, L., Muller, R., Vlatakis, G. y Mosbach, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92: 4788-4792.
15. Tuñón, P. Universidad e Oviedo. España, **2001**: 29-30.
16. Takeuchi, T., Fukuma, D. y Matsui, J. *Anal. Chem.* **1999**, 71: 285.
17. Chinella, I., Lotienzo, M., Piletsky, I., Tothill, I. y Turner, A. *Anal. Chem.* **2002**, 74: 1288.
18. Haupt, K. *Chem. Commun.* **2003**: 171-178.
19. Lisichkin, G. y Krutyakov, Y. *Russian Chemical Reviews*. **2006**, 75(10): 901-918.



20. Owens, P., Karlsson, L., Lutz, E. y Andersson, L. *Trends in Analytical Chemistry*. **1999**, 18(3):146-154.
21. Cormack, P. y Mosbach, K. *Reactive and Funcional Polymers*. 1999, 41: 115-124.
22. Kempe, H. y Kempe, M. *Macromol. Rapid. Commun.* **2004**, 25: 315-320.
23. Lisinchkin, G. y Krutyakov, Y. *Russian Chemical Rewiews*. **2006**, 75,10: 901-918.
24. Widstrand, C., Yilmaz, E., Boyd, B., Biling, J. y Rees, A. *American Laboratory*. **2006**, 38, 19: 12-14.
25. Whitcombe, M., Rodriguez, M., Villar, P. y Vulfson, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117: 7105.
26. Mosbach, K. y Ramstrom, O. *Biotechnology*. **1996**, 14:163-170.
27. Wulff, G; Sarhan, A. *Angew. Chem.* 1972, 11: 341.
28. Cormack, P. y Zurutuza, A. *Journal of Chromatography B*. **2004**,804: 173-182
29. Muldoon M y Stanker L. *Anal. Chem.* **1997**, 69: 803.
30. Dauwe C y Sallergren B. *J. Chromatogr.* **1996**, 753: 191.
31. Masque N.; Marce R y Borrul F. *Anal. Chem.* **2000**, 72: 4122.
32. Zhy L.; Chen L y Xu X. *Anal. Chem.* **2003**, 75: 6381.
33. Masque, N.; Marce, R. y Borrul, F. *Trends Anal. Chem.* **2001**, 20: 477.
34. Kempe, M. y Mosbach, K. *J. Chromatogr.* **1995**, 694: 3.
35. Sallergren, B. *Molecularly Imprinted Polymers*. Ed. Elsevier, **2001**.
36. Olsen, J.; Martin, P.; Wilson, I. y Jones, G. *Analyst*. **1999**, 124: 467.
37. Zhy Q.; Haupt K.; Knopp D y Niessner R. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, 468: 217.
38. Haupt, K.; Dzgoev, A. y Mosbach, K. *Anal. Chem.* **1998**, 70: 628.
39. Lanza, F.; Hall, A. y Sallergren, B. *Anal. Chim. Acta.* **2001**, 435: 628.
40. Bjarnason, B.; Chimuka, L. y Ramstrom, O. *Anal. Chem.* **1999**, 11: 2152.



41. Hwang, C. y Lee, W. *J. Chromatogr.* **2001**, 765: 45.
42. Matsui, J.; Nicholls, L. y Takeuchi, T. *Anal. Chim.* **1998**, 365: 89.
43. Huang, X.; Zou, H. y Chen, X. *J. Chromatogr.* **2003**, 984: 273.
44. Widstrand, C., Yilmaz, E., Boyd, B. y Ress, A. *The column.* **2006**: 20-24.
45. Ramstrom, O., Andersson, L. y Mosbach, K. *J. Org. Chem.* **1993**, 58: 7562.
46. Haginaka, J. *Bioseparation.* **2002**, 10: 337-351.
47. Whitcombe, M., Rodriguez, M., Villar, P. y Vulfson, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117: 7105.
48. Vlatakis, G., Andersson, L., Muller, R. y Mosbach, K. *Nature*, **1993**, 361: 645.
49. Stahl, M., Jeppson-Wistrand, U. y Mansson, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113: 9366.
50. Kriz, D., Ramstrom, O. Y Mosbach, K. *Ana. Chem.* **1997**, 69: A345-A349.
51. Andersson, L., Papricia, A. y Arvidsson, T. *Chromatographia.* **1997**, 46: 57- 62.
52. Hart, B., Rush, D. y Shea, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122: 460-465.
53. Skudar, K.; Bruggermann, O.; Wittelsberger, A. y Ramstrom, O. *Anal. Commun.* **1999**, 36: 327-331.
54. Piletska, E., Guerreiro, R., Romero-Guerra, M. y Piletsky, A. *Analytica Chimica Acta.* **2007**, 607: 54-60
55. Berggren, C., Bayoudh, S., Sherrington, D. y Ensing, K. *J. Chromatogr. A.* **2000**, 889: 105.
56. Rashid, B., Briggs, R. Hay, J. y Stevenson, D. *Anal. Commun.* **1997**, 34: 303.
57. Andersson, L. *Analyst.* **2000**, 125: 1515.
58. Sallergren, B. y Shea, K. *J. Chromatogr.* **1993**, 635: 31.
59. Zander, A.; Findlay, P.; Renner, T.; Sallergren, B. y Sweitlow, A. *Anal. Chem.* **1998**, 70: 3304.
60. Mullet, W. y Lai, E. *Anal. Chem.* **1998**, 70: 3636.