



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas -Programa de Doctorado en Ciencias con mención
en Química

**Síntesis de Polímeros Impresos Molecularmente (MIPs)
en formato micro y nano métrico, para preconcentrar
difenilamina y para ser utilizados como receptores en el
test de ELISA.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en
Química

CÉSAR ALEJANDRO CÁCERES FUENTES
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Dr. Eduardo Pereira Ulloa
Dpto. de Química Analítica e Inorgánica, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción



Agradecimientos.

En primera instancia quiero agradecer a la Universidad de Concepción, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas que me recibió, y me aceptó como parte de esta gran institución.

En segundo lugar quiero agradecer al estado chileno y en especial a la comisión nacional de investigación científica y tecnológica (CONICYT), a la beca de estudios doctorales 21110603 por el financiamiento y la confianza durante todos estos años, sin ellos hubiese sido imposible para mi poder realizar mis estudios de postgrado.

Le agradezco a la vida y a todos sus devenires. A todas las personas que han sido parte de este logro, comenzando por mi familia, mi padre mi madre y mi hermano que nunca dejaron de apoyarme a lo largo de esta historia. Le Agradezco a todos los profesores que han sido parte de mis estudios comenzando en la Universidad Tecnológica Metropolitana en el año 2004. A los profesores que me formaron como científico en la Universidad de Chile en el año 2009-2010. Y por último a todos los profesores de la Universidad de Concepción, en especial a los del departamento al que pertenezco Analítica e Inorgánica. Por supuesto una mención especial al Dr. Eduardo Pereira por su empatía y espíritu crítico durante los últimos 5 años, espero y no me cabe duda que serán muchos más, quiero agradecerle a todos mis compañeros y amigos por estar en las buenas y en las malas. Le agradezco a todo el personal de la facultad desde los auxiliares hasta la decanatura, ya que todos hacen que este barco navegue a buen puerto, por ende todos son necesarios e imprescindibles.

Le agradezco al centro de Centro de Investigación de Polímeros Avanzados (CIPA) por su colaboración durante las primeras etapas de este trabajo de tesis.

Le agradezco a la dirección de postgrado de la Universidad de Concepción y al convenio de desempeño UCO 1202, por su constante apoyo tanto en la asistencia a congresos internacionales y pasantías en el extranjero y su ayuda en diversos temas extracurriculares, gracias por la disposición de colaborar, en especial a Víctor Torneria.

Le agradezco al Profesor Sergey Piletsky de la Universidad de Leicester por recibirme en su grupo de investigación, si bien en esta pasantía aprendí técnicas de síntesis vanguardistas. Obtuve algo mucho más importante que cualquier cosa relacionada con la química. Allí conocí al amor de mi vida y actual esposa, te amo Ewa gracias por ser parte de mi presente y mi futuro.

Gracias a todos

César

Resumen.

El objetivo de este trabajo es la obtención y caracterización de polímeros impresos molecularmente (MIPs) en dos formatos (micro y nano métrico).

Los MIPs son polímeros sintéticos que presentan un elevado grado de selectividad hacia la adsorción de un gran número de analitos. Este proceso de reconocimiento se basa en la formación de cavidades específicas dentro del MIP, que se forman durante el proceso de síntesis del mismo.

En primera instancia la síntesis de MIPs en tamaño micrométrico tiene como fin obtener una herramienta que pueda ayudar a los cuerpos criminalísticos en la recolección de evidencia relacionada con el disparo de un arma y el posterior análisis de esta evidencia. Para llevar esto a cabo se propone el desarrollo de MIPs en tamaño micrométrico para la retención de residuos orgánicos de disparo, en especial difenilamina (DFA). Para esto se sintetizaron MIPs y sus análogos no impresos molecularmente (NIPs), siguiendo una estrategia no covalente, llevada a cabo mediante polimerización radical en solución. Se utilizaron distintos tipos de monómeros y como molécula plantilla se utilizó DFA. Para tener una evaluación más clara de cómo las variables sintéticas influyen en las propiedades del material obtenido se utilizó un diseño de experimentos de compuesto central, con cuatro variables (cantidad de plantilla, entrecruzador, iniciador y solvente). Se verificó la capacidad de adsorción de los MIPs y NIPs mediante espectrometría UV-VIS y se estudió el mecanismo de adsorción mediante isothermas de adsorción y estudios cinéticos.

En segunda instancia se realizó la síntesis de MIPs en tamaño nanométrico (nanoMIPs) con el objetivo de reemplazar anticuerpos utilizados en el test de ELISA. Los analitos seleccionados son biotina ($244,31 \text{ g mol}^{-1}$) y melamina (126 g mol^{-1}). Para llevar a cabo la síntesis de los nanoMIPs se utilizó la estrategia de síntesis en fase sólida, donde se inmovilizan los analitos a una matriz sólida, en este caso perlas de vidrio, para luego llevar a cabo la polimerización. Se obtuvieron nanoMIPs con una composición similar para ambos analitos. La polimerización de nanoMIPs para biotina se llevó a cabo mediante iniciación química en agua. Para melamina se realizó la síntesis de nanoMIPs mediante iniciación química en agua y en paralelo se realizó la síntesis en medio orgánico con una posterior derivatización de los nanoMIPs obtenidos con PEG.

Los nanoMIPs obtenidos se inmovilizaron en microplatos del test de ELISA, para luego llevar a cabo un estudio competitivo de ELISA entre los analitos (biotina y melamina) libres y conjugados con una enzima que revela la señal analítica para este test. Este ensayo presentó buenos resultados para los nanoMIPs sintetizados para biotina en agua, pero pésimos para melamina en agua. Este problema fue resuelto utilizando los nanoMIPs para melamina sintetizados en medio orgánico y derivatizados con PEG.

Este estudio demuestra que con la preparación de nanoMIPs mediante síntesis en fase solida se pueden producir materiales con un alto grado de afinidad, y con potencial para remplazar anticuerpos en el test de ELISA. Esto demuestra lo versátil y aplicable que puede llegar a ser esta tecnología.



Abstract

The main objective of this work is the obtaining and characterization of molecularly imprinted polymers (MIPs) in two different formats (micro and nano particles).

The MIPs are synthetic polymers with a high degree of selectivity to the adsorption of a large number of analytes. The procedure of molecular recognition is based in the formation of specific cavities inside of the MIP during the synthesis of the same.

The first part of the work shows the synthesis of micro MIPs, and the goal is to obtain a criminalistics tool which will help for the recollection of evidence which is related with a residue of gun shoot. For this purpose they are developed MIPs microparticles for the detection and recollection of organic gun shoot residues, especially Diphenylamine (DFA). The MIPs and the blanks NIPs, were synthesized following a non covalent strategy, the initiation of the synthesis was made by radical solution polymerization. They were used different types of monomers, and the template was DFA. To have a clearer idea of how the synthetic variables affect the final polymer was used a design of experiments, with four variables (quantity of; template, crosslinker, initiator and solvent). The adsorption capacity of MIPs and NIPs was checked by adsorption isotherms and kinetic studies.

The second part of the work involves the synthesis of MIPs in a format of nanoparticles (nanoMIPs), with the goal of replace some antibodies in the ELISA test. The analytes were Biotin ($244,31 \text{ g mol}^{-1}$), and Melamine (126 g mol^{-1}). For the synthesis of the nanoMIPs it was used the solid phase approach, where the analytes are immobilised in a solid matrix, in these case glass beads, after the immobilization of the analytes is made the polymerization. The nanoMIPs were obtained with a similar composition for both analytes. The nanoMIPs for biotin were made by chemical initiation in water. The nanoMIPs for melamine were made in water, by chemical initiation, and in organic media by photopolymerization, the organic nanoMIPs were derivatized with PEG.

All the nanoMIPs were tested in the ELISA test, first they were immobilized in the ELISA microplates, second they were tested in a competitive assay of ELISA between the free analytes and the analytes labelled with HRP which reveals the analytical signal for the assay.

The assay shows good results for nanoMIPs made in water for biotin, but very bad results for the nanoMIPs made in water for melamine. These problem was fixed using the nanoMIPs made for melamine but synthesized in organic media with a shield of PEG.

This study demonstrate that the preparation of nanoMIPs by solid phase synthesis, can be produce with a high degree of affinity, with the potential to replace antibodies in the ELISA test. This shows how versatile can become this technology.

This study demonstrates that in the preparation of nanoMIPs by solid phase synthesis materials can be produced with a high degree of affinity with the potential to replace antibodies in the ELISA test. Which shows how versatile and applicable that can become this technology.



AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
ÍNDICE.....	8
 CAPÍTULO I, INTRODUCCIÓN.....	 19
ANTECEDENTES TEÓRICOS.....	19
1.1 Polímeros Funcionales.....	19
1.2 Polímeros Impresos Molecularmente (MIPs).....	20
1.3 Modelos de la síntesis de MIPs.....	23
1.4 Optimización del proceso de síntesis: mini-MIPs.....	25
1.5 Control de efectos de impresión: NIPs.....	25
1.6 Factores que influyen en la síntesis de MIPs.....	25
1.6.1 Plantilla.....	26
1.6.2 Monómero.....	26
1.6.3 Solvente (porógeno).....	26
1.6.4 Entrecruzador.....	27
1.6.5 Iniciador.....	27
1.7 Modelos de la síntesis de MIPs, diferentes formatos para distintas aplicaciones.....	27
1.7.1 Síntesis en masa.....	27
1.7.1.1 Membranas y películas.....	28
1.7.1.2 Polimerización en capas.....	29
1.7.1.3 Electropolimerización <i>in-situ</i>	29
1.7.2 Síntesis en disolución.....	30
1.7.2.1 Polimerización en disolución para la obtención de microesferas.....	30
1.7.2.2 Polimerización por precipitación.....	31
1.7.2.3 Polimerización en suspensión.....	32
1.7.3 Nanopartículas.....	32
1.8 Síntesis de NanoMIPs.....	34
1.8.1 Polimerización por precipitación.....	34
1.8.2 Polimerización por mini-emulsión.....	35
1.8.3 Nanogeles solubles.....	36
1.9 Determinación de la capacidad de adsorción para MIPs y nanoMIPs.....	37
1.10 Análisis Forense.....	38
1.11 Anticuerpos y test de ELISA.....	41
 HIPÓTESIS.....	 45

OBJETIVOS GENERALES.....	46
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
CAPÍTULO II, PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
2.1 Materiales y reactivos.....	47
2.1.1 Reactivos utilizados en la síntesis de MIPs y NIPs.....	47
2.1.2 Reactivos utilizados en la síntesis de nanoMIPs.....	48
2.2 Materiales y equipos.....	49
2.2.1 Polimerización de MIPs y NIPs.....	49
2.2.2 Lavado de MIPs.....	49
2.2.3 Tamizado y molienda de MIPs y NIPs.....	49
2.2.4 Extracción de la plantilla en MIPs.....	49
2.2.5 Retención de DFA por parte de MIPs.....	50
2.2.6 Estudios cinéticos en MIPs.....	50
2.2.7 Isotermas de Adsorción.....	50
2.2.8 Caracterización de MIPs y NIPs.....	50
2.2.9 Sistema de preparación de fases sólidas para sintetizar nanoMIPs	51
2.2.10 Sistema de síntesis de nanoMIPs.....	51
2.2.11 Caracterización de nanoMIPs.....	51
2.2.12 Preparación de las especies conjugadas Biotina-HRP (HRP-B) y melamina-HRP (HRP-M).....	51
2.2.13 Ensayo competitivo entre biotina vs HRP-B y Melamina vs HRP- M.....	51
2.3. Metodología de trabajo.....	52
2.3.1 Metodología de trabajo en la obtención, caracterización y aplicación de MIPs y NIPs.....	52
2.3.1.1 Síntesis de mini-MIPs.....	52
2.3.1.2 Protocolo de la síntesis de mini-MIPs.....	57
2.3.1.3 Lavado de MIPs y NIPs.....	59
2.3.1.4 Extracción de la plantilla en MIPs.....	59
2.3.1.5 Molienda y tamizado de MIPs y NIPs.....	59
2.3.1.6 Implementación de metodología analítica para identificar y cuantificar difenilamina.....	59
2.3.1.7 Estudios de retención para MIPs y NIPs.....	60
2.3.1.8 Estudios de la cinética de retención en MIPs y NIPs.....	60
2.3.1.9 Isotermas de Adsorción de DFA en MIPs y NIPs.....	61

2.3.2 Metodología de trabajo para la obtención caracterización y uso de nanoMIPs.....	62
2.3.2.1 Preparación de fases sólidas con biotina y melamina	62
2.3.2.2 Síntesis de nanoMIPs para biotina y melamina en agua, mediante polimerización química.....	64
2.3.2.3 Síntesis de nanoMIPs para melamina en acetonitrilo con y sin recubrimiento de PEG, mediante polimerización vía UV.....	64
2.3.2.4 Caracterización de nanoMIPs.....	66
2.3.2.5 Preparación de Biotina conjugada con HRP.....	66
2.3.2.6 Preparación de Melamina conjugada con HRP.....	67
2.3.2.7 Inmovilización de los nanoMIPs en los microplatos del test de ELISA.....	67
2.3.2.8 Condiciones de análisis en el test de ELISA.....	68
CAPÍTULO III, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	69
3.1 Rendimiento de polímeros	69
3.2 Síntesis de Mini-MIPs.....	70
3.3 Rendimiento de MIPs y NIPs seleccionados.....	74
3.4 Caracterización de MIPs.....	77
3.4.1 Espectroscopia infrarroja (FT-IR)	77
3.4.2 Caracterización de MIPs mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	80
3.4.3 Caracterización de MIPs mediante análisis termogravimétrico (TGA).....	92
3.5 Implementación de metodología analítica para cuantificar DFA.....	95
3.6 Estudio de Retención de miniMIPs	97
3.7 Análisis estadístico del rendimiento de miniMIPs.....	103
3.8 Estudio de retención de los MIPs y NIPs.....	114
3.9 Estudios Cinéticos.....	118
3.10 Isotermas de adsorción.....	120
3.10.1 Isotermas de adsorción.....	120
3.10.2 Isotermas linealizadas de Freundlich y Langmuir.....	127
3.11 Síntesis y caracterización de nanoMIPs.....	137
3.12 Preparación de las esferas de vidrio derivatizadas para melamina y biotina.....	137
3.13 Síntesis de nanoMIPs para biotina y melamina en agua, mediante polimerización química.....	139
3.14 Síntesis de nanoMIPs para melamina en acetonitrilo con y sin pegilación, mediante polimerización iniciada fotoquímicamente.....	143
3.15 Ensayos competitivos de pseudo-ELISA utilizando nanoMIPs.....	148

CAPITULO IV, CONCLUSIONES.....	154
CAPITULO V, DIFUSIÓN DEL TRABAJO.....	157
5.1 Publicaciones científicas.....	157
5.2 Presentaciones a congresos.....	157
BIBLIOGRAFÍA.....	160
Anexos.....	165

LISTA DE FIGURAS.

Figura N°1. N° de publicaciones y patentes presentadas al año en el área de MIPs.....	20
Figura N°2. Representación esquemática del proceso de impresión molecular, mostrando algunas de las interacciones que se utilizan para crear afinidad en los sitios de enlace para el templado.....	22
Figura N°3. Microscopía electrónica de barrido para nanoMIPs a) 7500x, b) 30000x(la línea a la derecha corresponde a 1 μm . adaptado de Ye y col., 1999 ⁶⁹	34
Figura N°4. Esquema de una munición.....	39
Figura N°5. Esquema de síntesis que se lleva a cabo para obtener los miniMIPs, y los MIPs.....	57
Figura N°6. Esquema de cómo se llevan a cabo los estudios de retención para miniMIPs, MIPs y NIPs.....	60
Figura N°7. A) Protocolo de síntesis para la inmovilización de melamina en las esferas de vidrio. B) Protocolo de síntesis para la inmovilización de biotina en las esferas de vidrio.....	63
Figura N°8. Esquema de síntesis para la obtención de: nanoMIP sin derivatizar (A) y nanoMIPs derivatizados con PEG (B). La mezcla de polimerización para la obtención de nanoMIPs en medio orgánico es la número 1, la mezcla de síntesis para la obtención de nanoMIPs en medio acuoso es la número 2 (Adaptado de César Cáceres y col., ¹⁰⁵).....	66
Figura N°9. Esquema de inmovilización de nanoMIPs en los microplatos del test de ELISA.....	67
Figura N°10. Análisis competitivo de pseudo ELISA para detectar y cuantificar biotina y melamina.....	68

Figura N°11. Rendimiento de las síntesis de miniMIPs correspondientes al sistema N°1.....	70
Figura N°12. Rendimiento de las síntesis de miniMIPs correspondientes al sistema N°2.....	71
Figura N°13. Rendimiento de las síntesis de miniMIPs correspondientes al sistema N°3.....	72
Figura N°14. Efecto de las variables (a) iniciador y (b) entrecruzador sobre el rendimiento de los miniMIPs para el sistema 1, 2 y 3.....	73
Figura N°15. Rendimiento para MIPs y NIPs seleccionados.....	75
Figura N°16. Espectro FT-IR para los MIPs 1,2 y 3, medidos en KBr a 25°C.....	78
Figura N°17. Espectro FT-IR para los MIPs 4, 5 y 6 medidos en KBr, a 25°C.....	78
Figura N°18. Espectro FT-IR para los MIPs 7, 8 y 9, medidos en KBr a 25°C.....	79
Figura N°19. Micrografías de barrido electrónico del MIP 1, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)3500x y c)55000x.....	81
Figura N°20. Micrografías de barrido electrónico del MIP 2, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)10000x.....	82
Figura N°21. Micrografías de barrido electrónico del MIP 3, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)10000x.	83
Figura N°22. Micrografías de barrido electrónico del MIP 4, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)10000x.	85
Figura N°23. Micrografías de barrido electrónico del MIP 5, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)10000x.....	86
Figura N°24. Micrografías de barrido electrónico del MIP 6, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)3500x y c)50000x.....	87
Figura N°25. Micrografías de barrido electrónico del MIP 7, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)3500x y c)55000x.....	88
Figura N°26. Micrografías de barrido electrónico del MIP 8, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)3500x.....	89
Figura N°27. Micrografías de barrido electrónico del MIP 9, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)3500x y c)55000x.....	90

Figura N°28. Análisis termogravimétrico para MIPs 1,2 y 3.....	92
Figura N°29. Análisis termogravimétrico de los MIPs 4, 5 y 6.....	93
Figura. N°30. Análisis termogravimétrico para los MIPs 7, 8 y 9.....	94
Figura N°31. Espectrograma obtenido para DFA en una solución 50:50 Etanol:Agua...	95
Figura N°32. Curva de calibración para DFA. Las barras de error corresponden a ± 1 la desviación estándar.....	96
Figura N°33. Capacidades de Retención de DFA por los miniMIPs sintetizados en el sistema N°1.....	97
Figura N°34. Esquema de posible interacción no enlazante entre el la unidad repetitiva VPi y la molécula DFA.....	98
Figura N°35. Capacidades de Retención de DFA por los miniMIPs sintetizados en el sistema N°2.....	99
Fig. N°36. Esquema posible interacciones no enlazantes entre la unidad repetitiva VIm y la molécula DFA.	100
Figura N°37. Capacidades de Retención de DFA por los miniMIPs sintetizados en el sistema N°3.	101
Figura N°38. Esquema de posible interacción no enlazante entre la unidad repetitiva AAm y la molécula DFA.	102
Figura N°39. Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de los miniMIPs del sistema 1 con respecto al rendimiento.	105
Figura N°40. Efectos principales para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 1...	105
Fig. N°41. Superficie de respuesta estimada para evaluar el rendimiento de los miniMIPs del sistema 1 con respecto al entrecruzador y el solvente.	106
Figura N°42. Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de los miniMIPs del sistema 2 con respecto al rendimiento.	108
Figura N°43. Efectos principales para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2...	109
Figura N°44. Superficie de respuesta estimada para evaluar el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2 con respecto al entrecruzador y el solvente.....	110

Figura N°45. Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de los miniMIPs del sistema 3 con respecto al rendimiento.	112
Figura N°46. Efectos principales para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2...	112
Figura N°47. Superficie de respuesta estimada para evaluar el rendimiento de los miniMIPs del sistema 3 con respecto al entrecruzador y el iniciador.....we.....	113
Figura N°48. Porcentajes de retención de DFA en MIPs y NIPs para los 3 sistemas seleccionados. Las barras de error corresponden a ± 1 la desviación estándar.....	114
Figura N°49. Evaluación del tiempo de retención de DFA por parte de MIPs 1, 2 y 3 y NIPs 1, 2 y 3.	118
Figura N°50. Evaluación del tiempo de retención de DFA por parte de MIPs 4, 5 y 6 y NIPs 4, 5 y 6.	118
Fig. N°51. Evaluación del tiempo de retención de DFA por parte de MIPs 7, 8 y 9 y NIPs 7, 8 y 9.	119
Figura N°52. Clasificación de isothermas de adsorción BDDD.....	120
Figura N°53. Isothermas de Adsorción para MIP y NIP 1 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40 °C.	121
Figura N°54. Isothermas de Adsorción para MIP y NIP 2 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40 °C.	121
Figura N°55. Isothermas de Adsorción para MIP y NIP 3 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.....	122
Figura N°56. Isothermas de Adsorción para MIP y NIP 4 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.	123
Figura N°57. Isothermas de Adsorción para MIP y NIP 1 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.	124
Figura N°58. Isothermas de Adsorción para MIP y NIP 6 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.	125
Figura N°59. Isothermas de Adsorción para MIP y NIP 7 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.	125
Figura N°60. Isothermas de Adsorción para MIP y NIP 8 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.	126

Figura N°61. Isotermas de Adsorción para MIP y NIP 9 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.	127
Figura N°62. Capacidad máxima de adsorción de DFA para MIPs y NIPs 1, 2 y 3 a distintas temperaturas.....	133
Figura N°63. Capacidad máxima de adsorción de DFA para MIPs y NIPs 4, 5 y 6 a distintas temperaturas.....	134
Figura N°64. Capacidad máxima de adsorción de DFA para MIPs y NIPs 7, 8 y 9 a distintas temperaturas.	135
Figura N°65. Monómeros, entrecruzador e iniciador utilizados en la síntesis de nanoMIPs en agua.	139
Figura N°66. Esquema de síntesis de nanoMIPs sintetizados en agua, para melamina y biotina.	140
Figura N°67. micrografías TEM para nanoMIPs producidos en optimas condiciones. a) nanoMIPs hechos para biotina. b) nanoMIPs hechos para melamina. Ambos obtenidos en medio acuoso.	142
Figura N°68. Monómeros, entrecruzador e iniciador utilizados en la síntesis de nanoMIPs en ACN.	143
Figura N°69. Esquema de enlaces de hidrógeno entre AMA y melamina.....	144
Figura N°70. Esquema de síntesis de nanoMIPs sintetizados en ACN, para melamina.....	145
Figura N°71. Micrografías TEM para nanoMIPs obtenidos en optimas condiciones en ACN. a) nanoMIPs para MEL sin PEGb. b) nanoMIPs para MEL con PEG.....	147
Figura N°72. Capacidad de adsorción de HRP-B y HRP-M por los nanoMIPs respectivos, los blancos son los microplatos sin nanoMIPs, pero con el procedimiento de bloqueo y lavado (descrito previamente). Las barras de error representan la desviación estándar de cada experimento realizado en triplicado.	149
Figura N°73. Ensayo competitivo de Pseudo-ELISA para biotina, llevado a cabo con nanoMIP específicos para biotina y nanoMIPs específicos para melamina para evaluar la selectividad. Las barras de error representan la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.	150
Figura N°74. Ensayo competitivo de Pseudo-ELISA para melamina. Las barras de error representan la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.....	151

Figura N°75. Curva de calibración obtenida mediante pseudo test de ELISA para melamina, llevada a cabo con nanoMIPs específicos para melamina con y sin recubrimiento de PEG. Barras de error representan ± 1 la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.153

LISTA DE TABLAS.

Tabla N°1. Resumen comparativo de propiedades físicas y químicas entre MIPs y nanoMIPs.33

Tabla N°2. Compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en residuos y composición base de la pólvora.....40

Tabla N°3. Estructuras de reactivos a utilizar en la síntesis de MIPs.....52

Tabla N°4. Sistemas de síntesis para la molécula objetivo DFA.....52

Tabla N°5. Factores que se varían durante la síntesis de MIPs y la cantidad de los factores que se considera mínima y máxima.53

Tabla N°6. Nombre de los experimentos y orden en que se realizan, por otra parte incluye las cantidades de cada variable sintética en cada experimento.....53

Tabla N°7. Cantidades requeridas de las variables sintéticas de acuerdo al diseño de experimentos para la síntesis de miniMIPs del sistema 1.....54

Tabla N°8. Cantidades requeridas de las variables sintéticas de acuerdo al diseño de experimentos para la síntesis de miniMIPs del sistema 2.55

Tabla N°9. Cantidades requeridas de las variables sintéticas de acuerdo al diseño de experimentos para la síntesis de miniMIPs del sistema 3.56

Tabla N°10. Cantidades requeridas calculadas para las síntesis de MIPs y NIPs.....58

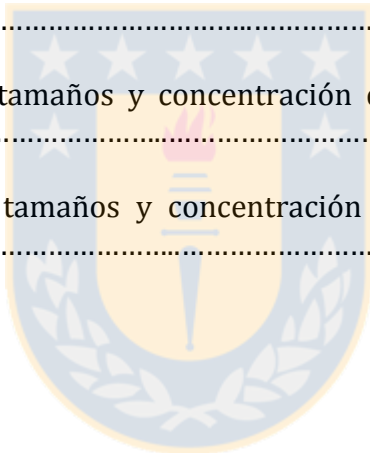
Tabla N°11. Rendimiento para MIPs y NIPs seleccionados de cada sistema.....74

Tabla N°12. Análisis de varianza para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 1.....104

Tabla N°13. Combinación de los niveles de los factores a la cual se maximiza el rendimiento de los miniMIPs del sistema 1.107

Tabla N°14. Análisis de varianza para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2107

Tabla Nº15. Combinación de los niveles de los factores a la cual se maximiza el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2.	110
Tabla Nº16. Análisis de varianza para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 3	111
Tabla Nº17. Combinación de los niveles de los factores a la cual se maximiza el rendimiento de los miniMIPs del sistema 3.....	113
Tabla Nº18. Parámetros de unión calculados a partir de isothermas linealizadas para MIPs y NIPs 1, 2 y 3.....	128
Tabla Nº19. Parámetros de unión calculados a partir de isothermas linealizadas para MIPs y NIPs 5, 6 y 7.....	130
Tabla Nº20. Parámetros de unión calculados a partir de isothermas linealizadas para MIPs y NIPs 7, 8 y 9.....	131
Tabla Nº21. Absorbancias, tamaños y concentración de nanoMIPs sintetizados en medio acuoso.....	141
Tabla Nº22. Absorbancias, tamaños y concentración de nanMIPs sintetizados en medio acuoso.....	146





Capítulo I, Introducción

Antecedentes Teóricos.

1.1 Polímeros funcionales

Los polímeros adsorbentes (resinas) basados en monómeros funcionales, potencialmente ofrecen claras ventajas sobre los adsorbentes tradicionales, debido a su capacidad de carga y a la posibilidad de regeneración sólo mediante lavado con solución ácida o alcalina en condiciones ambientales.

Una de las clases más versátiles de polímeros que son aplicados en muchas áreas son los polímeros funcionales. El término polímero funcional tiene dos significados: (a) polímeros que poseen grupos funcionales (tales como carboxilo, hidroxilos o aminos) los cuales definen la reactividad del polímero y (b) la caracterización de una función específica para la cual un determinado polímero es producido y usado. La función en este último caso puede ser más bien una función química tal como una reactividad específica o una función física como la conductividad eléctrica¹. Según esto, un polímero funcional es un polímero que exhibe una reactividad específica o que tiene especificidad física, biológica, farmacológica o relacionada con otro uso que depende de los grupos químicos que posea.

Los polímeros pueden ser sintetizados por diferentes vías. Algunas de las exigencias más importantes para los usos tecnológicos de estos polímeros son, una ruta barata de síntesis, una adecuada masa molar, una adecuada distribución de la masa molecular, una buena estabilidad química, entre otros. Los procedimientos sintéticos más usuales para la elaboración de polímeros son la polimerización por adición, especialmente la polimerización radicalaria.

Las macromoléculas pueden ser homo o copolimerizadas y pueden contener uno o más grupos funcionales, ya sea en la cadena principal o en la cadena lateral.

En la búsqueda de nuevos materiales que presenten características de reconocimiento molecular las resinas poliméricas tienen aceptación, se han utilizado resinas altamente entrecruzadas como adsorbentes, con una buena estabilidad química y mecánica, mostrando una alta capacidad de adsorción.

En técnicas analíticas, las resinas poliméricas han ganado atención como un novedoso tipo de adsorbente con propiedades atractivas, especialmente para la extracción y preconcentración de analitos a través de extracción en fase sólida (SPE).

En este sentido, una clase especial de resinas poliméricas denominadas “polímeros

impresos molecularmente (MIPs)” surgen con un tremendo potencial en este tipo de aplicaciones^{2, 3}.

1.2 Polímeros impresos molecularmente (MIPs)

Entre todas las alternativas de sistemas que existen para llevar a cabo reconocimiento molecular, los polímeros impresos molecularmente (MIPs) muestran un gran desarrollo. El incremento en el número de publicaciones y patentes aparecidas prácticamente se ha triplicado en los últimos veinte años (ver Figura 1)⁴, reflejando así el potencial de estos materiales, y el interés científico a nivel mundial en el desarrollo de MIPs.

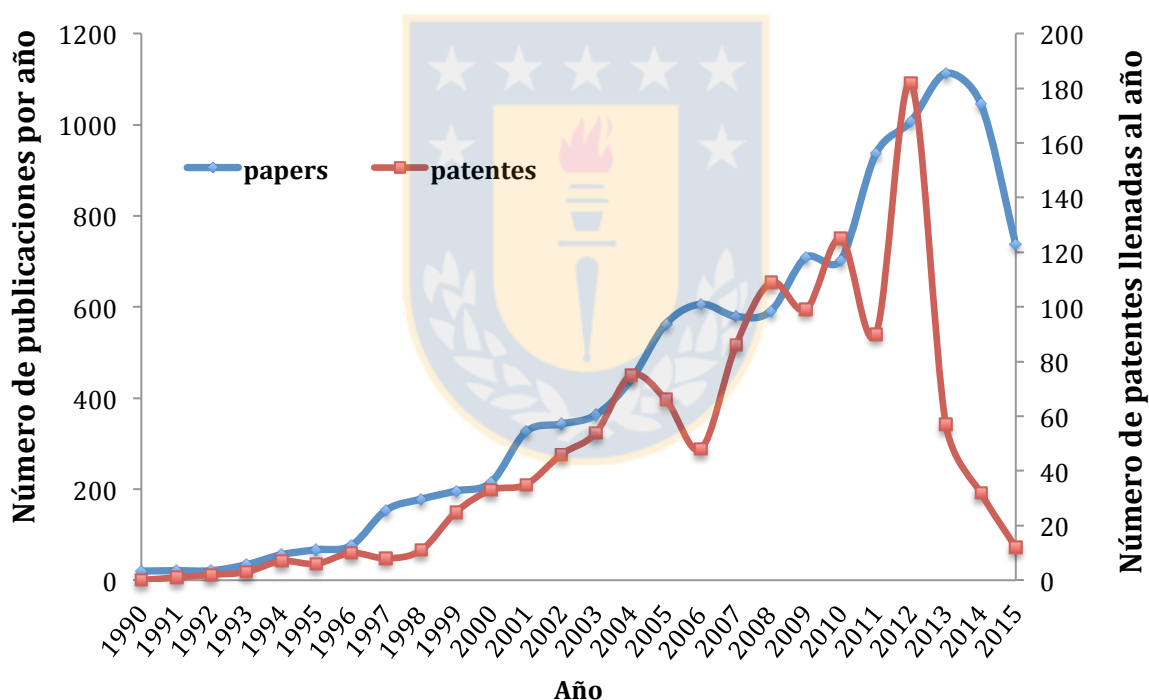


Figura N°1. N° de publicaciones y patentes presentadas al año en el área de MIPs

La historia de la tecnología de impresión molecular se remonta a 1931, año en el que Polyakov⁵ descubrió que el gel de sílice era capaz de reconocer a determinados aditivos que estaban presentes durante la fabricación y secado del mismo. Basándose en la teoría de la formación de los anticuerpos postulada por Linus Pauling⁶, Dickey fue capaz de explicar los hallazgos de Polyakov, al demostrar el reconocimiento por parte de la sílice de diferentes indicadores derivados del naranja de metilo que se

encontraban presentes durante la obtención del gel de sílice^{7,8}. No obstante, la baja estabilidad de este tipo de materiales limitó considerablemente el avance de esta línea de investigación⁹. Después de más de 40 años de los descubrimientos de Polyakov, entre los años 70-80, los trabajos desarrollados por Wulff ¹⁰, Takagishi y Klotz ¹¹ y Mosbach¹² demostraron la presencia de la impronta o huella molecular en polímeros orgánicos. A partir de entonces, el desarrollo de la tecnología de impresión molecular ha seguido un crecimiento progresivo.

La impresión molecular es una forma de creación de sitios de reconocimiento en materiales poliméricos, en este proceso los monómeros son polimerizados o copolimerizados en presencia de un entrecruzador, y una molécula plantilla (que actúa como una plantilla molecular). Los monómeros funcionalizados inicialmente forman un complejo con la molécula plantilla, y siguen haciéndolo después de la polimerización ya que sus grupos funcionales son llevados a una posición fija debido a que la cadena polimérica está altamente entrecruzada. La sustracción subsecuente de la molécula plantilla revela sitios de enlaces que son complementarios en tamaño y forma. En este sentido, se introduce una memoria molecular en el polímero, que es ahora capaz de re-enlazar selectivamente a la molécula objetivo¹³⁻¹⁶. En la Figura 2, se muestra una representación esquemática de la síntesis de polímeros impresos molecularmente¹⁷.

Esta síntesis consta de tres etapas básicas, que aparecen esquematizadas en la Figura 2. Durante la primera etapa, se ponen en contacto la molécula plantilla y el o los monómeros, dando lugar a la formación del complejo de prepolimerización. Es importante destacar que las propiedades del polímero obtenido dependen en gran medida del tipo de enlace formado entre el monómero y la plantilla. En la segunda etapa se lleva a cabo la polimerización propiamente dicha. Esta polimerización generalmente sigue un mecanismo de propagación radicalaria y puede estar inducida tanto térmica como fotoquímicamente.

Por último, en la tercera etapa se elimina la plantilla de la matriz polimérica, liberando así las cavidades creadas en la matriz que son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química a la molécula plantilla. La presencia de estas cavidades, teóricamente, hace que el polímero impreso sea capaz de reconocer de forma selectiva tanto al analito, plantilla como a otros compuestos estructuralmente análogos.

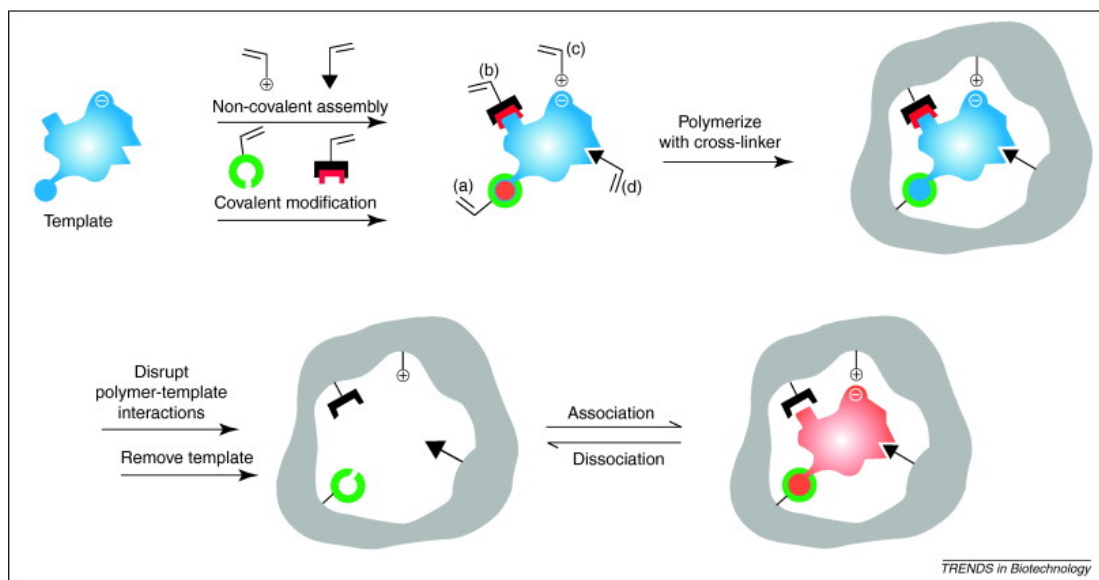


Figura N°2. Representación esquemática del proceso de impresión molecular, mostrando algunas de las interacciones que se utilizan para crear afinidad en los sitios de enlace para el templado.

Los polímeros impresos molecularmente se pueden considerar como sitios enlazantes muy específicos y han sido usados en aplicaciones donde eventos de enlace molecular son de gran interés, incluyendo; materiales de separación hechos a la medida, imitación de receptores y anticuerpos en inmunoensayos y sistemas de detección y elementos de reconocimiento en biosensores. Estas aplicaciones se ven beneficiadas con una mayor estabilidad física y química y un menor costo por parte de los polímeros impresos molecularmente comparándolos con sus contrapartes biológicas¹⁸⁻²¹.

Una gran diferencia con respecto a las biomoléculas es que los MIPs son generalmente estables a bajos y altos pHs, presiones y temperaturas. Por otra parte los MIPs son capaces de conservar las capacidades de reconocimiento molecular por periodos de tiempo mayores que los anticuerpos, o receptores naturales²². Además son más económicos, fáciles de obtener y se pueden utilizar en solventes orgánicos. Finalmente, se pueden sintetizar MIPs para diversas clases de sustancias, como: iones²³, ácidos nucleicos²⁴, proteínas²⁵⁻²⁷, drogas²⁸, entre otras.

1.3. Modelos de la Síntesis de MIPs.

La naturaleza de la interacción entre el monómero y la plantilla es actualmente uno de los criterios más empleados para la clasificación de los MIPs, ya que afecta considerablemente a las propiedades del polímero final obtenido. Así, es posible distinguir entre polímeros covalentes, no covalentes y semi covalentes, cuyas principales características se describen a continuación.

- **Covalente:** Este tipo de síntesis de MIPs fue introducido por Wulf y colaboradores (1972-1982)¹⁰. Los polímeros covalentes se caracterizan porque la unión se realiza a través de un enlace covalente entre la plantilla y el monómero, tanto durante la polimerización, como en el reconocimiento posterior de los analitos. En la mayoría de los casos, las plantillas empleadas han sido sintetizadas en el laboratorio.

La ventaja fundamental de este tipo de polimerización reside en su sobresaliente selectividad, ya que al realizarse la síntesis en condiciones estequiométricas, no hay monómeros fuera de las cavidades, lo que minimiza considerablemente la presencia de interacciones inespecíficas¹⁷. Otra ventaja importante de estos polímeros es su elevada homogeneidad, lo que en principio es de gran interés para determinadas aplicaciones, como son su empleo como fases estacionarias en HPLC²⁹ o en el desarrollo de sensores químicos³⁰.

Entre los principales inconvenientes de los polímeros covalentes se encuentran, por un lado, el limitado número de monómeros existentes capaces de formar un enlace covalente reversible con la plantilla y, por otro, el impedimento estérico que supone la necesidad de formar un enlace covalente entre el monómero y la plantilla, al imponer serias restricciones en la disposición espacial de los grupos funcionales de ambos compuestos.

A demás, la síntesis de estos polímeros es considerablemente más compleja que la de los polímeros no covalentes, ya que se requiere de la síntesis previa del compuesto “plantilla – monómero”, así como un tratamiento químico agresivo con objeto de romper el enlace covalente formado y eliminar el analito plantilla, liberando las cavidades responsables del posterior reconocimiento en la matriz polimérica. Debido a estas limitaciones, y a pesar de haber sido los primeros polímeros en desarrollarse, su aplicación analítica ha sido considerablemente escasa¹⁷.

- **Semi covalente:** Es una variación de la síntesis previamente mencionada, este método síntesis fue introducido por Sellergren y Anderson (1990)³¹, y consiste en llevar a cabo la etapa de impresión utilizando un monómero funcional

enlazado (unido) a la plantilla (generalmente a través de un enlace éster), mientras que el proceso de re-unión entre la cavidad y el analito se lleva a cabo por interacciones no enlazantes tales como enlaces de hidrogeno e interacciones electroestáticas. La molécula plantilla se remueve de la matriz polimérica a través de una hidrólisis, permitiendo así liberar la cavidad para un posterior uso, que se da mediante enlaces de hidrogeno e interacciones no enlazantes principalmente.

Desafortunadamente, este proceso no es tan ventajoso como parece, porque la hidrólisis de la molécula plantilla, para liberar la cavidad puede no ser fácil de realizar debido al impedimento estérico. Por otra parte, los mismos aspectos estéricos también podrían interferir con las interacciones no covalentes en la etapa de reconsolidación¹⁷.

- No covalente: son aquellos MIPs en los que la interacción entre la plantilla y el monómero tiene lugar a través de la formación de interacciones no covalentes intermoleculares, tipo enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas, tanto durante la síntesis del polímero como durante el reconocimiento posterior de los analitos. Debido a la amplia disponibilidad comercial de monómeros y plantillas capaces de dar lugar a una interacción estable de este tipo, junto a la facilidad de la síntesis de estos materiales, los polímeros no covalentes son, sin lugar a dudas, los más empleados en la actualidad¹⁷.

En el primer trabajo realizado por Arshady y Mosbach (1981)³² se describe la preparación de un polímero impreso no covalente sintetizado empleando metacrilato de metilo como monómero funcional que, mediante fuerzas electrostáticas, forma un complejo de prepolimerización con N,N'- fenildiacrilamida.

Los polímeros impresos han sido usados en varias técnicas analíticas, incluyendo cromatografía líquida, electrocromatografía capilar, extracción en fase sólida, ensayos de enlaces de ligandos, y en la tecnología de sensores. En el campo de las separaciones analíticas, la aplicación más cercana de los MIPs a la realización práctica es probablemente la extracción en fase sólida SPE. Varios grupos ya han aplicado extracción en fase sólida basada en MIPs en muestras ambientales y biológicas y esta técnica es bien aceptada de manera general. La técnica ha sido referida varias veces como MIP-SPE o MISPE. Siguiendo el primer estudio MIP-SPE empleando un MIP selectivo para pentamidina en un modelo de enriquecimiento de muestras de orina en línea³³, numerosos grupos han presentado aplicaciones de SPE, extracción cuantitativa de la muestra y elución de varios tipos de analitos³⁴.

1.4. Optimización del proceso de síntesis: mini-MIPs.

La cantidad de variables que influyen en las características finales del polímero son muchas, por lo que la optimización del proceso es muy compleja. Uno de los métodos utilizados para la optimización es el empleo de los denominados mini-MIPs. El empleo de mini-MIPs fue desarrollado por los grupos de Takeuchi³⁵ y Sellergren³. Esta técnica se basa en la preparación de disoluciones, en donde se mezclan pequeñas cantidades de cada uno de los reactivos que forman parte de la polimerización, variando la cantidad de cada reactivo sistemáticamente. Luego de la extracción de la plantilla y continuos lavados del polímero, se evalúa el reconocimiento molecular para cada polímero. Una vez evaluadas las condiciones óptimas de polimerización se sintetizan mayores cantidades de aquellos polímeros para los que se obtuvo mayor grado de reconocimiento para una evaluación más detallada³⁶.

1.5. Control de efectos de impresión: NIPs.

Para poder controlar de efectos de impresión se pueden sintetizar polímeros no impresos molecularmente (NIPs), también llamados control de polímeros. Estos polímeros son obtenidos por la aplicación del mismo procedimiento de polimerización en ausencia de la plantilla. El NIP posee las mismas propiedades químicas que el MIP pero sin la presencia de alguna cavidad específica. Por lo tanto, la naturaleza de las interacciones desarrolladas entre el MIP y la plantilla es la misma que las desarrolladas entre el NIP y la plantilla, la diferencia entre estas dos resinas es la fuerza de estas interacciones. Si las cavidades creadas durante la polimerización son bien definidas, la fuerza de las interacciones es mucho mayor en el MIP que en el NIP porque la plantilla puede ser retenida por diferentes puntos (suma de las interacciones) debido a la complementariedad espacial de la plantilla en las cavidades³⁷.

1.6. Factores que influyen en la síntesis de MIPs.

La síntesis de MIPs debiera ser exclusiva para cada analito, las cavidades generadas en el polímero son dependientes de la estructura tridimensional de la molécula plantilla, considerándose éste como el principio de impresión molecular: la selectividad del MIP es entonces dependiente del proceso de síntesis. Así, entre los principales parámetros involucrados están la razón molar de los monómeros funcionales/plantilla, la clase y volumen del solvente, cantidades de entrecruzador e iniciador. Estos parámetros deben ser evaluados antes del diseño del proceso de síntesis de un nuevo MIP³⁸.

1.6.1. Plantilla.

El analito a estudiar se puede considerar como la molécula plantilla en algunos casos, y su estructura química determina el monómero funcional a utilizar en el proceso. En términos de compatibilidad con la polimerización radical, la molécula plantilla debería ser químicamente inerte bajo las condiciones de polimerización, es decir la molécula plantilla no debe tener grupos polimerizables, no debe tener la funcionalidad de retardar o inhibir la polimerización radical. La plantilla debería ser estable bajo las condiciones de síntesis (temperatura o irradiación UV) y soluble en el solvente usado¹⁷.

1.6.2. Monómero.

Los monómeros funcionales son las especies químicamente responsables de la formación de los sitios de enlace impresos en el polímero. La selección del monómero adecuado se realiza en función de la naturaleza de la molécula objetivo según sus características y grupos funcionales. Se espera que los enlaces entre el monómero y la plantilla, sean lo suficientemente fuertes como para formar un enlace, y lo suficientemente débiles para ser extraídos de la plantilla, se espera que entre el analito o plantilla y el monómero funcional existan interacciones complementarias que aumentan la afinidad y la selectividad de las cavidades generadas en la matriz polimérica. Generalmente, la cantidad de monómeros funcionales está en un relativo exceso con la plantilla para asegurar el equilibrio del complejo; generalmente se usa una razón molar mínima de 4:1³⁹. El ácido metacrílico y la 4-vinilpiridina pueden ser mencionados como los monómeros funcionales ácidos y básicos más usados frecuentemente.

1.6.3. Solvente (porógeno)

El disolvente o “porógeno” se elige en función de su capacidad para estabilizar el complejo de pre- polimerización formado entre el monómero funcional y la plantilla. Participan en el proceso de síntesis disolviendo todas las sustancias implicadas. Su constitución, concentración y volumen determina la morfología y la cantidad de poros, y así el área superficial. Solventes tales como diclorometano, acetonitrilo, tolueno, dimetilsulfóxido, y cloroformo han sido ampliamente usados en aproximaciones no covalentes¹⁹.

Una alta solubilidad de las especies involucradas en la síntesis en el solvente lleva a polímeros con una baja distribución de tamaño de poro y una alta área superficial mientras que una baja solubilidad lleva a poros grandes y bajas áreas superficiales³⁸. Este parámetro juega una pronunciada influencia en el equilibrio monómero

funcional-plantilla, el cual es más estable cuando se aplican solventes apolares y apróticos.

1.6.4. Entrecruzador.

El entrecruzador es responsable de entrecruzar todas las cadenas poliméricas con el fin de formar una resina tridimensional. Para obtener un reconocimiento molecular adecuado es necesario obtener materiales con una estructura tridimensional apropiada, siendo ésta la principal tarea que otorga el agente entrecruzador. El entrecruzamiento tiene tres grandes funciones; a) es el principal responsable de la morfología de la matriz polimérica, b) estabiliza los sitios de unión selectiva, c) confiere estabilidad mecánica y térmica al polímero sintetizado³⁸. Uno de los más usados es el etilenglicol dimetacrilato (EDMA) y el 1,4-divilbenceno (DVB).

1.6.5. Iniciador.

Los iniciadores radicales proporcionan los radicales libres para iniciar la polimerización. Los primeros radicales son formados por descomposición térmica o fotolítica, y comienza la polimerización de las sustancias involucradas en la polimerización. La temperatura de la polimerización se elige en función de la estabilidad térmica del iniciador, que debe fragmentarse para que comience el proceso de polimerización. El iniciador más comúnmente empleado en la preparación de polímeros de impresión molecular es el azo-bis-isobutironitrilo (AIBN), el cual se descompone en radicales tanto por la acción de radiación ultravioleta como por el calor a temperaturas superiores a 60°C³⁸.

1.7. Modelos de la síntesis de MIPs, diferentes formatos, para distintas aplicaciones.

1.7.1. Síntesis en masa.

Con respecto a la síntesis de MIPs, la polimerización en masa es el procedimiento más utilizado. La plantilla y los monómeros funcionales se adicionan en un matraz, donde las moléculas plantillas interactúan mediante fuerzas intermoleculares no enlazantes y/o enlazantes con los monómeros funcionales. Después, se adiciona un reactivo entrecruzador para enlazar todos los monómeros funcionales, resultando en una cadena que es polimerizada mediante un iniciador radical. Se genera un polímero aglomerado y amorfo, insoluble, que debe ser molido mecánicamente o mediante un mortero manual, para luego ser tamizado, obteniéndose partículas de un tamaño deseable (generalmente 5-500 μm). La plantilla se extrae mediante el lavado de las

partículas de polímero molido con un reactivo adecuado y este paso se puede completar mediante un procedimiento batch o en línea. Si bien este procedimiento es simple y conveniente presenta algunas limitaciones. En primer lugar, el proceso de molienda toma mucho tiempo y provoca una pérdida de una cantidad significativa de material (hasta 80% m/m)⁴⁰. Por otra parte, podría alterar o dañar la orientación correcta de los sitios impresos⁴¹. Además, estos últimos se encuentran principalmente en la parte interior de la matriz porosa. Esto reduce su accesibilidad, dando lugar a una mala transferencia de masa y la cinética de reconocimiento lentas. Las reacciones de polimerización por adición de radicales libres son de hecho exotérmica, asimismo el formato de polimerización en masa impide el intercambio de calor eficiente con el exterior. Esto puede llevar a un rápido incremento en la temperatura de la mezcla de polimerización hasta valores en los que la mayoría de los disolventes pueden ebullicir, con el consiguiente aumento de la presión dentro de la mezcla de reacción. Esto puede afectar negativamente a las propiedades MIP y puede conducir a explosiones en pequeña escala⁴². Además, después de la etapa de tamizado, se obtienen partículas de forma irregular.

Sin embargo, probablemente el principal inconveniente de polimerización en masa es que a menudo es difícil obtener una eliminación completa de la plantilla de los MIPs sintetizados. Esto a su vez podría resultar en el riesgo de fuga de la plantilla residual de la matriz, lo que puede interferir con la aplicación prevista, especialmente cuando se utiliza para el análisis de trazas⁴³.

Para optimizar el rendimiento de polímeros impresos vía polimerización en masa, es importante desarrollar un método sintético que les permite ser obtenidos en un formato estructural predefinido, adecuado para mejorar sus propiedades y hacerlos más apropiados con respecto a diferentes aplicaciones. Varios métodos ya se han desarrollado con el fin de obtener MIPs bajo diferentes formatos, como películas y membranas, micro y nanopartículas. Sin embargo, no es fácil adaptar los procesos de síntesis a estos nuevos formatos, por ende cada proceso nuevo necesita una síntesis en particular⁴⁴.

1.7.1.1. Membranas y películas.

Dos de los más importantes formatos que han sido investigados en la obtención de MIPs, especialmente cuando quieren obtener capas de MIPs que presenten una respuesta como sensores, son las películas y las membranas. Algunas de las formas de síntesis exploradas para estos formatos son, polimerización en capas y electropolimerización *in situ*.

1.7.1.2. Polimerización en capas.

Este método tiene la ventaja de poder obtener capas y/o membranas de MIP que son muy uniformes y reproducibles.⁴⁵⁻⁴⁷

Este método se ha utilizado muy recientemente por Sergeyeva y colaboradores⁴⁸, que sintetizaron membranas de MIP capaces de imitar las propiedades catalíticas de la enzima tirosinasa natural, con el fin de fabricar bio-sensores para la detección de fenoles.

Las membranas se obtuvieron a través de una polimerización radical termoiniciada llevada a cabo entre dos portaobjetos de vidrio, utilizados como un molde. Estas membranas de MIP exhiben buena actividad catalítica y selectividad hacia catecol, así como una buena estabilidad a largo plazo. Sin embargo, la porosidad del material ha tenido que ser mejorada, con la adición de polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular, otro de los contratiempos es que la sensibilidad es menor que muchos biosensores basados en la enzima natural.

Utilizando esta misma técnica de polimerización, Wu y colaboradores⁴⁹ fabricaron un sensor óptico para formaldehído, basado en los cambios de intensidad de reflexión óptica de la película MIP cuando es iluminado por un haz de láser en presencia de la plantilla. Por esta razón, la película de MIP fue fotopolimerizada directamente sobre una superficie después de la deposición de la mezcla de polimerización en un portaobjetos. De esta manera, se obtuvo una capa de MIP de aproximadamente 1 mm de espesor, lo que permitió conseguir una buena sensibilidad y selectividad para la plantilla impresa. Además, el sensor dio respuestas coherentes en hasta seis pruebas consecutivas, pero nuevamente la porosidad de la capa MIP ha tenido que ser ajustada cuidadosamente para garantizar un buen nivel de sensibilidad.

1.7.1.3. Electropolimerización *in situ*.

Este método es bastante útil, simple y versátil para preparar MIPs en capas con características reproducibles (porosidad, espesor entre otras), no necesita ningún iniciador químico, ni tampoco un tratamiento extenso post síntesis, solo la remoción de la molécula plantilla. Sin embargo solo un cierto tipo de monómeros puede ser utilizado, ya que tienen que presentar propiedades oxido reductoras (redox), lo que reduce la posibilidad de llevar a cabo con éxito el proceso de impresión molecular⁵⁰.

Un buen ejemplo de este método de obtención de MIPs se presenta en el trabajo de Choong y col.⁵¹, quienes desarrollaron un MIP obtenido por electropolimerización de pirrol utilizando cafeína como molécula plantilla, en matrices de nanotubos de carbon alineados verticalmente con diferentes densidades que actuaron como una superficie

en tres dimensiones para la deposición del MIP. Los sensores producidos se analizaron usando detección amperométrica pulsada (PAD) y mostraron una capacidad de unión mejorada con señales hasta 15 veces más altas que un sensor recubierto con una película delgada de MIP convencional.

1.7.2 Síntesis en disolución

Como se ha mencionado anteriormente el método más común para la preparación de MIPs es mediante una polimerización en masa seguido por trituración mecánica de la masa de polímero obtenido para así obtener partículas de tamaño deseado que generalmente corresponde a diámetros dentro del rango de micrómetros. La síntesis en disolución es ligeramente distinta: en este método sintético todos los componentes de la síntesis se disuelven en una sola fase, es decir la mezcla de la molécula plantilla, monómero, entrecruzador, iniciador y solvente porógeno se somete a la polimerización, que puede estar iniciada tanto fotoquímica como térmicamente.⁵² Una vez concluida, se obtiene un bloque de polímero insoluble que se tritura y tamiza hasta obtener partículas micrométricas amorfas. Una vez obtenido el polímero, se elimina el analito plantilla liberando las cavidades responsables del reconocimiento selectivo de los analitos. Este método que es por mucho el más utilizado, presenta muchas características atractivas, especialmente para las primeras síntesis de MIPs. Es rápido y simple en su ejecución y no requiere conocimientos especiales o instrumentos sofisticados. Las partículas de tamaño menores de 25 micrómetros generalmente se utilizan en estudios cromatográficos⁵³.

Aunque la polimerización en solución es simple y la optimización de las condiciones de impresión es relativamente sencilla, el método de polimerización presenta muchos inconvenientes. En primer lugar, las partículas obtenidas después de la etapa de tamizado presentan irregularidades en tamaño y forma de las partículas. También algunos sitios de interacción son destruidos durante la molienda, y así producen un impacto negativo en la capacidad de carga del MIP con respecto a los valores teóricos. Además el proceso de molienda y tamizado es engorroso y provocan una pérdida de polímero.

1.7.2.1. Polimerización en disolución para la obtención de microesferas.

Como ya se ha indicado anteriormente, los materiales impresos molecularmente suelen ser obtenidos como especies monolíticas, que luego se trituran y se tamizan para obtener las partículas de MIPs esperadas, las partículas obtenidas mediante estos métodos a menudo tienen formas irregulares y una amplia gama de tamaños. Por lo tanto, si están destinados a ser utilizados, por ejemplo, como fases estacionarias para procedimientos de cromatografía, proporcionan muy baja eficiencia de la columna,

junto con una distribución heterogénea de la afinidad de los sitios de unión. Por eso, la atención de los investigadores se ha desplazado hacia la obtención de partículas de polímero impresos en formas regulares, tanto de micro y nano tamaños⁵⁴.

Desafortunadamente, no todos los métodos que suelen ser utilizados para la obtención de partículas poliméricas monodispersas son adecuados para la tecnología de partículas impresas molecularmente, aspectos tales como el grado de reticulación requerido del entrecruzador para obtener impresiones estables de alta afinidad, o la necesidad de fuertes interacciones entre la plantilla y sus monómeros, deben ser optimizados para concretar la elección de los métodos sintéticos que pueden ser utilizados para obtener partículas MIP^{44, 55}.

Partículas de MIP de tamaño micrométrico son particularmente útiles para usos en cromatografía y extracción en fase sólida. En estas aplicaciones, se requieren propiedades de flujo precisas para mejorar la etapa de separación de los diversos analitos, estos polímeros están destinados para aplicaciones farmacéuticas, biomédicas o medioambientales. Hasta la fecha, este tipo de partículas generalmente han sido preparadas por polimerización en solución, por precipitación y polimerización en suspensión.

1.7.2.2. Polimerización por precipitación

Esta metodología es análoga a la polimerización en solución, si bien en este caso se emplea una mezcla de reactivos mucho más diluida al trabajar en exceso de disolvente. Como consecuencia, las cadenas poliméricas en formación no son capaces de ocupar el volumen total del disolvente, produciéndose una dispersión de partículas esféricas de polímero independientes en el seno de la disolución⁵⁶⁻⁵⁸. Entre las principales ventajas de esta técnica de polimerización se encuentran, además de la ya mencionada obtención de partículas esféricas, la obtención de un gran rendimiento de polimerización al no ser necesario someter el polímero obtenido a las etapas de triturado y tamizado. Además, se ha comprobado experimentalmente^{59, 60} que las partículas obtenidas por precipitación poseen, en comparación con las obtenidas mediante polimerización en masa, una mayor capacidad y una distribución más homogénea de los sitios de unión. Por lo general, el tamaño de partícula obtenido mediante este procedimiento es muy pequeño (alrededor de 1 μm) lo que genera problemas cuando se emplea como fase estacionaria en técnicas de separación. Una forma de controlar el tamaño de las partículas consiste en el control de la velocidad de agitación de la disolución de polimerización, siendo el tamaño de partícula tanto menor cuanto menor sea la velocidad de agitación.

1.7.2.3. Polimerización en Suspensión.

La polimerización en suspensión, es conocida como una de las mejores técnicas para la preparación de MIPs esféricos de tamaños micrométricos, y por lo general es utilizada para obtener partículas con un diámetro que van desde 3 μm a 20 μm . Se puede llevar a cabo tanto en medio acuoso y no acuoso. El proceso de polimerización consta en depositar la mezcla de polimerización en gotas que se suspenden en una fase continua. Esto a menudo requiere la ayuda de un estabilizador de la suspensión (tensoactivo)⁴⁴.

Las partículas obtenidas mediante esta técnica generalmente muestran buenas propiedades de reconocimiento, especialmente en términos de selectividad, pero su afinidad depende estrictamente de la polaridad del disolvente. De hecho, un disolvente altamente polar podría competir con la molécula plantilla por los sitios de unión, reduciendo de esta manera las interacciones específicas entre los grupos funcionales del MIP y las moléculas plantilla. Lo mismo puede ocurrir durante la etapa de polimerización, en el que la presencia de la fase acuosa polar de la suspensión puede interferir con las interacciones no covalentes entre las plantillas y los monómeros funcionales, lo que conduce a sitios de unión menos homogéneos y menos específicos. Por otra parte, dependiendo de los parámetros operacionales tales como la cantidad de estabilizador, el tamaño de las partículas obtenidas podría ser difícil de controlar, lo que lleva a obtener MIPs de tamaños bastante dispersos.

Para superar estos problemas, se han desarrollado otras técnicas de polimerización en suspensión que explotan diferentes fases continuas. Un método ha sido descrito por Mayes y Mosbach⁶¹ e implica el uso de fluorocarbonos líquidos como fase dispersante. Éstos son en su mayoría inmiscibles con muchos compuestos orgánicos, por lo que representan una buena fase inerte para la polimerización en suspensión.

La polimerización en suspensión utilizando fluorocarbonatos también ha sido utilizada en la síntesis de micropartículas de MIP directamente en *catridges* de extracción en fase sólida (SPE), mediante iniciación UV⁶².

1.7.3 Nanopartículas.

Las nanopartículas han ganado una gran importancia en distintas áreas del conocimiento, como la farmacéutica, la clínica y la analítica entre muchas más. Por lo mismo no es sorprendente que muchos grupos hayan comenzado a sintetizar partículas de impresión molecular en esta escala. En la tabla N°1 se resumen las principales diferencias entre los MIPs sintetizados a en masa y los MIPs sintetizados en formato nanométrico (nano MIPs).

Tabla Nº1. Resumen comparativo de propiedades físicas y químicas entre MIPs y nanoMIPs.

MIPs en masa	nanoMIPs
Posible pérdidas de la molécula plantilla durante el proceso de síntesis.	La molécula plantilla no se pierde durante la síntesis, ya que esta enlazada químicamente al soporte.
Gran variabilidad de los sitios de enlace, con variación en la afinidad, alto nivel de enlaces no específicos.	Afinidad similar en todos los sitios de enlace, 2-3 órdenes de magnitud de diferencia entre enlaces específicos y no específicos.
Afinidades en el rango de 10^{-9} – 10^{-3} molL ⁻¹ dependiendo de la molécula plantilla.	Afinidades en el rango de 10^{-10} – 10^{-6} molL ⁻¹ , posibilidad de usar estas partículas en métodos altamente selectivos.
Material insoluble, en general es difícil de procesar	Partículas solubles en medios orgánicos y acuosos
Alta variación entre una síntesis a otra, dependiendo del proceso de síntesis.	Un mejor control en el proceso de síntesis cuando se utilizan reactores automatizados.
Perspectivas limitadas para el uso de aplicaciones <i>en vivo</i> .	Se pueden producir nanoMIPs con fines biológicos.

Los nanoMIPs tienen una mayor relación superficie-volumen y una superficie total activa mayor que sus similares en formato micrométrico. Por otra parte las cavidades es decir, los sitios de enlace, son más accesibles a los analitos que se desean adsorber, lo que mejora la cinética de enlace y facilita el proceso de remoción de la molécula plantilla, aumentando el rendimiento de la síntesis y las capacidades físicas y químicas de la partícula impresa molecularmente en general.

Por otra parte la síntesis de nanoMIPs se ajusta bien a los modelos de impresión de superficies.⁶³ Además, dado que los nanoMIPs pueden ser suspendidos en solución es más fácil dosificarlos con precisión, por ejemplo, para su uso en ensayos ELISA⁶⁴.

NanoMIPs han sido sintetizados con distintos propósitos, como substitutos de

enzimas para catalizar reacciones químicas,⁶⁵ como liberador controlado de fármacos⁶⁶, como substitutos de antibióticos en ensayos de enlace y como constituyentes en el desarrollo de sensores^{64, 67, 68}.

1.8. Síntesis de nanoMIPs.

1.8.1 Polimerización por precipitación.

Este modelo de síntesis fue utilizado la primera vez en 1999 por Ye y colaboradores⁶⁹. (ver figura 4) En este tipo de síntesis los monómeros están presentes en un exceso de solvente (son solo el 2% del volumen global de la mezcla de reacción). En este tipo de síntesis las cadenas de polímero crecen hasta que se hacen insolubles en la solución, por lo que precipitan en el medio de la reacción, con este modelo de síntesis no es necesario utilizar un agente estabilizador para las nanopartículas, lo que es muy útil en la síntesis no covalente. Por otra parte la técnica es fácil, no consume mucho tiempo y ofrece buenos porcentajes de rendimiento.

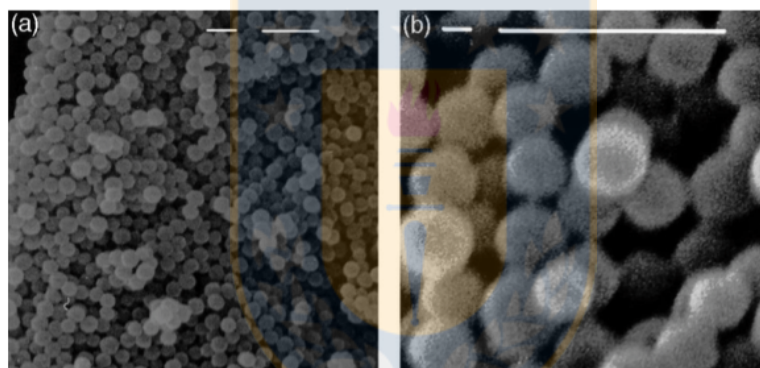


Figura N°3. Microscopía electrónica de barrido para nanoMIPs a) 7500x, b) 30000x(la línea a la derecha corresponde a 1 μm . adaptado de Ye y col., 1999 ⁶⁹.

En el año 2003, Li y colaboradores⁷⁰ estudiaron en detalle los efectos de la concentración de los monómeros, la temperatura de polimerización y las concentraciones y tipos de entrecruzadores en el tamaño y la uniformidad de los nanoMIPs obtenidos a través de la técnica previamente descrita

Ciardelli y colaboradores, en el año 2004⁶⁶ modificaron la síntesis desarrollada por Ye y colaboradores (1999), para investigar si se podría mejorar la capacidad de enlace de los nanoMIPs utilizando una mezcla de ácido meta acrílico (AMM) como monómero funcional y metil meta acrilato (MMA) como monómero “no funcional”. Trabajando en su hipótesis sintetizaron una gran cantidad de nanoMIPs para teofilina variando la relación entre AMM/MMA. Corroborando los trabajos previos se dieron cuenta que los diámetros de los nanoMIPs son inferiores que los diámetros de los nanoNIPs. Más interesante aún es que observaron que el tamaño de las partículas disminuyó de 232 a

200 nm a medida que la cantidad de AMM aumentaba, lo que les dio una evidencia de las fuertes interacciones que se produjeron entre el monómero y la plantilla durante la síntesis de los nanoMIPs.

Otro de los trabajos representativos es el de Yoshimatsu y colaboradores (2007)⁶⁸, en el que investigaron como controlar el tamaño de los nanoMIPs polimerizados por el método de precipitación, en particular se enfocaron en relacionar el tamaño de estos con la cantidad de entrecruzador utilizada en el proceso de síntesis, encontrando que para nanoMIPs sintetizados con divinilbenceno como entrecruzador se obtuvieron nanoMIPs polidispersos con un porcentaje de rendimiento más bien reducido. Por otra parte, al utilizar triacrilato de trimetilolpropano (TMPTA) como entrecruzador se obtuvo buenos porcentajes de rendimiento, una baja polidispersidad y tamaños de partículas menores entre 100-300 nm.

De lo anteriormente explicado se desprende que la estrategia de polimerización por precipitación para obtener nanoMIPs es una herramienta útil que presenta buenos resultados, es relativamente simple y rápida. Sin embargo el hecho de que los monómeros deben estar altamente diluidos para evitar el entrecruzamiento entre estos mismos representa un límite en esta técnica, debido a que hay que utilizar grandes cantidades de solventes y de molécula plantilla, lo que no siempre es económico, o comercialmente viable. La elevada disolución también presenta un problema en la fuerza de las interacciones entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales. Más aún esta técnica requiere un control elevado en las variables propias de la síntesis y la condición de ésta, por ejemplo el tipo de iniciador, la temperatura y el tamaño y la forma del reactor. Para así tener un mejor control del tamaño, la forma y las propiedades de impresión del producto obtenido.

1.8.2. Polimerización por mini emulsión.

Otro método que se ha utilizado para obtener nanoMIPs es la mini-polimerización en emulsión. Su aplicación en la síntesis de nanoMIPs es bastante reciente, y se llevó a cabo por primera vez por Vaihinger y colaboradores⁷¹, que trabajaron para obtener un nanoMIP impreso con L- o D-Boc-fenilalanina. La polimerización en emulsión se lleva a cabo normalmente mediante la producción de una emulsión orgánica / acuosa en la que el monómero, entrecruzador y la plantilla están en la fase dispersa, mientras que el iniciador se encuentra en la fase acuosa continua. El proceso de polimerización se lleva a cabo a continuación, en micelas compuestas de la mezcla de polimerización y estabilizadas por un agente tensoactivo adecuado. Sin embargo, esto por lo general da lugar a grandes micropartículas. La mini-polimerización en emulsión es muy similar, pero, además, implica una etapa de homogeneización y el uso de un co-sufractante para obtener partículas en el rango de 50-500 nm.⁷² El co-sufractante es

necesario para suprimir la difusión en la fase acuosa continua y para aumentar la estabilidad y la homogeneidad del sistema. De esta manera, se puede obtener las nanopartículas deseadas.

En resumen, el método de polimerización por mini emulsión también sufre de varios inconvenientes para la producción de nanoMIPs. De hecho, incluso si se pueden producir pequeños nanoMIPs esféricos, la presencia de varios productos químicos (tensioactivos, co-sufractantes y estabilizantes) pueden interferir con el proceso de impresión, ampliando así la distribución afinidad de los sitios de unión. Este problema podría remediarse mediante el uso de enfoques de impresión molecular semi-covalentes, pero esta estrategia no siempre es tan efectiva ya que depende de la naturaleza química de la molécula plantilla. Por otra parte, las etapas de purificación necesarias para eliminar todas estas sustancias son bastante largas y tediosas, y aun así podrían no ser lo suficientemente efectivas en la eliminación de todas las sustancias químicas que interfieren.

1.8.3 Nanogeles solubles.

Un primer intento de sintetizar nanoMIPs solubles en agua se llevó a cabo en 1998 por el grupo de Piletsky y sus colaboradores⁷³, que investigaron la posibilidad de preparar nanoMIPs impresos para el tilacoide de la proteína D1, llevando a cabo una amplia molienda y un posterior tamizado de los MIPs obtenidos en masa. Una mezcla de ácido urocánico como monómero funcional y N,N'-bisacriloilopiperazina como entrecruzador, esta mezcla se polimerizó en agua en presencia de la plantilla, con el iniciador N, N, N, N'-tetrametiletilendiamina. Los bloques obtenidos se lavaron a continuación con ácido clorhídrico diluido para eliminar la plantilla, luego se muelen acuciosamente y por último se ultrafiltraron durante la centrifugación. El problema de esta síntesis es que el rendimiento es muy bajo. Si bien este método de síntesis no perduró, éste fue el puntapié inicial a la síntesis de nanoMIPs solubles en medio acuoso con posible actividad biológica.

La síntesis de nanoMIPs representa todo un reto, la posibilidad de obtener “enzimas artificiales” o más aún “anticuerpos sintéticos” abre todo un abanico de oportunidades a la tecnología de impresión molecular. Gracias a las estrategias de síntesis que son relativamente sencillas, y a la gran compatibilidad de procedimientos de síntesis, este tipo de materiales es promisorio. Si se comparan nanoMIPs con microMIPs los primeros son mucho más simples de caracterizar ya que se pueden utilizar todas las técnicas de caracterización en que las macromoléculas deben estar en solución. Sin embargo los métodos de síntesis que existen hoy en día pueden y deben ser mejorados, especialmente en términos de rendimientos de la reacción y de la purificación de los materiales obtenidos. Sin lugar a duda muy pronto la síntesis de

nanoMIPs en forma de gel solubles podrán proveer una alternativa viable a las moléculas biológicas utilizadas en sensores, procesos de separación y en catálisis. Incluso más interesante puede ser el desarrollo de este tipo de materiales para aplicaciones *in vivo* como liberador controlado de drogas y en aplicaciones de diagnóstico.

1.9. Determinación de la capacidad de adsorción para MIPs y nanoMIPs

A pesar del gran número de estudios sobre MIPs, el empleo simultáneo de diferentes tipos de monómeros (ácido, básico y neutro) en la mezcla de polimerización no ha sido estudiado sistemáticamente. Al mismo tiempo, no muchos estudios se han dedicado a establecer la relación entre las variables en la síntesis de MIPs y la capacidad de adsorción de moléculas orgánicas. Además, otros tipos de interacción entre monómeros y la molécula plantilla con el fin de obtener sitios de adsorción más específicos, como las interacciones tipo π - π *stacking*, aún no han sido consideradas dentro de los estudios.

Uno de los aspectos más importantes en la extracción en fase sólida es establecer la capacidad de adsorción y el mecanismo de la resina polimérica para adsorber las moléculas orgánicas en cuestión. El método más adecuado para estudiar estas propiedades de enlace es obtener las isothermas de adsorción. La isoterma de Langmuir-Freundlich (LF) es capaz de modelar la adsorción de un adsorbato tanto en NIPs como en MIPs, distribuciones homogéneas y heterogéneas tanto en altas como en bajas concentraciones de analitos. La validez del modelo de LF con respecto a MIPs se demuestra utilizando cinco sistemas de la literatura que representan tanto a materiales homogéneos como heterogéneos. El modelo LF también facilita ampliamente los cálculos correspondientes de los parámetros de enlace⁷⁴. La isoterma LF (Ec. 1) -también conocida como ecuación Sips⁷⁵ es una función que describe una relación específica entre la concentración en equilibrio de las especies enlazadas (B) y libres (F) en sistemas heterogéneos con tres coeficientes: N_t , a , y m .

$$B = \frac{N_t a F^m}{1 + F^m} \quad (\text{ec.1})$$

N_t es el número total de sitios de enlace. El parámetro “ a ” está relacionado a la afinidad media de enlace (K) mediante $K = a^{1/m}$. Además “ m ” es el índice de heterogeneidad, el cual varía desde 0 hasta 1. Para un material homogéneo, $m=1$. Cuando $m < 1$, el material es heterogéneo. En contraste de lo que sucede con la isoterma heterogénea de Freundlich, el modelo LF tiene la ventaja de que no se

requiere una medida independiente del número total de sitios de enlace (N_t), el cual es sumamente difícil de medir en MIPs heterogéneos.

La isoterma LF ha sido de gran utilidad en el modelamiento del comportamiento de adsorción en muchos sistemas heterogéneos, incluyendo la adsorción de gases en superficies^{76, 77}, afinidad de ligandos hacia anticuerpos policlonales y adsorción de iones metálicos en muestras ambientales. Como el nombre lo implica, la isoterma LF está compuesta de las isotermas de Langmuir y Freundlich y se puede reducir a cualquiera de los dos en sus límites. Por ejemplo, cuando $m=1$, la isoterma LF (ecuación 1) se reduce a la isoterma de Langmuir (ecuación 2), la cual corresponde directamente a la afinidad de enlace (K). Si no, como F o “ a ” si se aproxima a cero, la isoterma LF se reduce a la isoterma de Freundlich (ecuación 3). Se puede notar que la isoterma LF se reduce a la isoterma de Freundlich a bajas concentraciones. Así, el modelo de enlace LF es capaz de modelar superficies de enlace tanto homogéneas como heterogéneas.

$$B = \frac{N_t a F}{1 + a F} \text{ para } m = 1 \quad (\text{ec.2})$$

$$B = aF^m \text{ para } m \ll 1 \quad (\text{ec.3})$$

En los trabajos extensivos del área no se ha observado un trabajo sistemático que relacione las variables de la síntesis de MIPs, con la capacidad máxima de adsorción de los analitos de interés tampoco se ha abarcado de forma integral la morfología de las resinas obtenidas con las distintas variables de la síntesis en solución. En este sentido las constantes dieléctricas, y las polaridades de los monómeros y solventes dentro de la mezcla de polimerización deben tener un lugar importante en el entendimiento de la morfología de las resinas obtenidas.

1.10 Análisis Forense.

La balística forense es la ciencia que estudia los fenómenos que ocurren en el interior del arma durante el disparo de un proyectil, su trayectoria desde el momento que abandona la boca del arma de fuego hasta su impacto y los efectos producidos en el organismo durante el recorrido, al igual que las formas y características de las armas de fuego y sus municiones. Los elementos que se analizan corresponden a: armas de fuego, proyectiles, fragmentos, vainillas, municiones perdigones, portas, prendas de vestir y elementos con residuos de disparo y restos óseos que requieran estudio balístico^{78, 79}.

Estos estudios se pueden realizar gracias a la química analítica forense, que se define como una disciplina aplicada al análisis criminalístico y es una de las áreas de la química analítica en donde la naturaleza de las muestras y el uso de la información analítica juegan un importante rol en seleccionar y ejecutar la técnica analítica apropiada. Esta parte de la ciencia forense ofrece la caracterización y cuantificación de sustancias químicas a nivel de trazas, que a menudo se refiere a compuestos explosivos, residuos de disparo, tintas y materiales de escritura.

En situaciones de uso real o supuesto de armas de fuego, la detección e identificación de materiales residuales de la descarga de este tipo de armas puede proporcionar valiosa información de investigación. Estos residuos se componen principalmente de partículas quemadas y sin quemar por las cargas de propulsión, así como los componentes del cartucho, la bala, la vaina del cartucho (figura 4) y de la propia arma de fuego, y son generalmente denominados residuos de disparo⁷⁹.

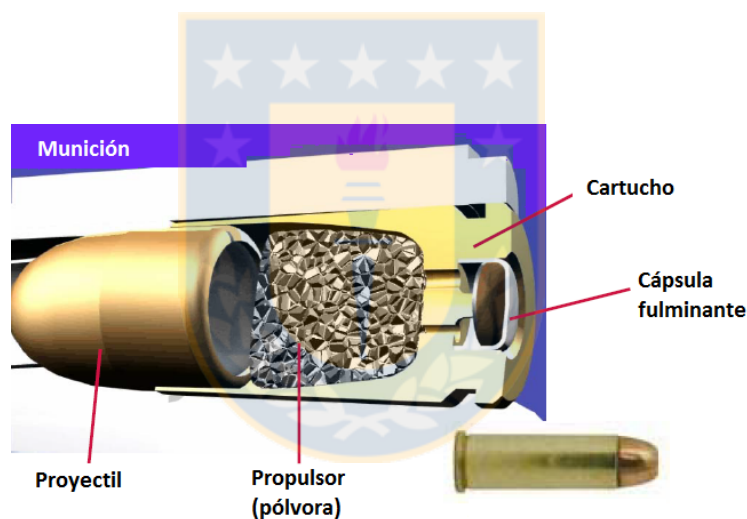


Figura N°4. Esquema de una munición

La pólvora sin humo es el principal propulsor de municiones civiles y militares y es el explosivo común de baja intensidad más utilizado para fabricar artefactos explosivos improvisados, como bombas de tubo. Aunque este tipo de pólvora puede contener hasta 23 compuestos orgánicos, está elaborado principalmente por los propulsores de nitrocelulosa (NC). También hay otros aditivos claves, incluido el material energético nitroglicerina (NG) y los estabilizadores de difenilamina (DFA), N-nitrosodifenilamina (NnDFA) y etil centralita (N,N'-dietil -N,N'-difenilurea, EC)⁸⁰.

Todas las pólvoras además de explosivos contienen numerosos aditivos que cumplen un rol especial como estabilizante, plastificante, inhibidor de inflamación, refrigerante, lubricantes de superficie y aditivos anti desgaste. Un tipo de pólvora en particular puede contener uno o más de estos aditivos dependiendo de su uso⁸¹.

Datos bibliográficos mencionan una lista de compuestos orgánicos e inorgánicos que pueden estar presentes en los residuos y composición base de la pólvora (Tabla N°2)⁸².

Tabla N°2. Compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en residuos y composición base de la pólvora.

Componentes de residuos de disparo	Uso
<i>Orgánicos</i>	
Nitroglicerina	Propelente
Resorcinol	Estabilizante
Metilcentralita	Estabilizante
Difenilamina	Estabilizante
Etilcentralito	Estabilizante
2,4-Dinitrotolueno	Inhibidor de inflamación
2,6-Dinitrotolueno	Inhibidor de inflamación
2,3-Dinitrotolueno	Inhibidor de inflamación
Dimetilftalato	Plastificante
Dietilftalato	Plastificante
Dibutilftalato	Plastificante
<i>Inorgánicos</i>	
Bario	Antioxidante
Hierro	Material del proyectil
Níquel	Material del proyectil
Zinc	Material del proyectil
Plomo	Explosivos (plomo estífnato)

Determinar el contenido de aditivo tiene importantes aplicaciones forenses. En la investigación de los artefactos explosivos improvisados utilizando pólvora sin humo, posterior a la explosión se recogen residuos para la evaluación en el laboratorio de los aditivos contenidos en un medio característico de los polvos recogidos, para la posterior determinación de la fuente⁸⁰.

En la investigación, del uso de armas de fuego, los residuos orgánicos de disparo (OGSR) y municiones pueden estar asociados con una evaluación cuantitativa de la relación de la NG al total estabilizador contenido⁸³⁻⁸⁵.

El análisis de los residuos orgánicos de disparo (OGSR) resultantes de la combustión incompleta de la pólvora sin humo, surge como un enfoque alternativo para la detección de si se ha percutido un arma de fuego o explosivos^{86,87}. La detección de si se ha percutido o no un arma de fuego depende de la medición de los componentes orgánicos característicos de la pólvora. Los más comunes que son determinados son el propulsor nitroglicerina (NG) y los estabilizantes incluidos centralito de etilo (CE), así como difenilamina (DFA) y su producto de la N- nitrosodifenilamina (NnDFA). Es importante destacar que los componentes orgánicos característicos de la pólvora no se han encontrado en la población general, debido a este hecho la detección de estos aditivos en la ropa o manos de un sospechoso es una buena indicación de que él ha manipulado y percutado un arma de fuego⁸⁸. A menudo se utiliza una cinta adhesiva para recoger las muestras de residuos orgánicos de disparo⁸⁸. Sin embargo, el uso de adhesivos puede resultar en interferencias en la extracción y medición de componentes orgánicos característicos de la pólvora de los residuos recogidos. La disolución del polímero adhesivo en un disolvente utilizado para la recuperación de compuestos orgánicos característicos de la pólvora presenta limitaciones en el análisis, incluyendo el extracto acuoso basado en métodos de separación por precipitación y la interferencia del espectro de absorción de la radiación UV del compuesto orgánico adhesivo⁸⁹.

Por eso, la limpieza y preconcentración de muestras suelen ser necesarias para llegar a los límites de detección más bajos en el análisis de OGSR. La extracción en fase sólida (SPE) utilizando materiales selectivos reutilizables puede ser una excelente alternativa en la detección de estas sustancias.

1.11. Anticuerpos y test de ELISA.

Los procesos de reconocimiento molecular tienen un papel muy importante en una gran cantidad de aplicaciones, como catálisis química, diagnósticos médicos, separación de sistemas y liberación de drogas en el cuerpo. Receptores moleculares naturales, tales como enzimas y anticuerpos son altamente utilizados tanto en estudios de reconocimiento molecular, como en desarrollo de sistemas de diagnóstico⁹⁰.

En este sentido los anticuerpos dominan sin lugar a dudas el mercado de las aplicaciones comerciales de este tipo de estudios. Para poner un ejemplo el mercado de los anticuerpos monoclonales en 2009 fue evaluado en 40 billones de dólares, donde 30 billones de dólares son relacionados con aplicaciones terapéuticas⁵².

Los anticuerpos son proteínas que nuestro inmunosistema sintetiza para detectar y neutralizar sustancias dañinas para nuestro cuerpo (por ejemplo, virus, bacterias y

toxinas) más conocidas como antígenos.⁹¹

El anticuerpo más conocido y utilizado es la inmunoglobina G, que posee una forma de Y, como resultado del arreglo de dos cadenas “largas” y dos cadenas “cortas”, todas ellas estabilizadas por enlaces disulfuros. Con un peso molecular entre los 150-160 kDa. La parte inferior de “Y” es denominada como la región Fc, y tiene un rol en conferir tanto estabilidad, como dirigir las interacciones con otros componentes del sistema inmunológico. La parte superior de la “Y” es denominada región Fab, y es la responsable de la interacción entre el anticuerpo y el antígeno respectivo⁵³. La interacción anticuerpo-antígeno es llevada a cabo por una combinación precisa de interacciones electroestáticas, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, y/o interacciones hidrofóbicas, lo que se refleja en el resultado de una interacción extremadamente fuerte⁹¹.

Los anticuerpos son sin lugar a dudas compuestos altamente específicos y selectivos para un gran número de compuestos químicos y biológicos, y pueden ser producidos a relativa gran escala⁹². Desafortunadamente como es lógico también presentan desventajas. Su producción industrial se basa en el cultivo de líneas celulares de mamíferos modificadas (por ejemplo, los de ovario de hámster chino (CHO) y el riñón embrionario humano (HEK) -2930).

El proceso de fabricación de los anticuerpos es difícil y costoso^{53, 57, 93}. Además, la producción de anticuerpos contra moléculas pequeñas requiere acoplamiento químico entre haptenos y una proteína portadora con el fin de generar una respuesta inmune en animales⁹² y su purificación implica varios pasos (especialmente para aplicaciones en la terapia), que contribuyen hacia los costes de fabricación de un 50 a un 80% del total^{58, 59}. Por otra parte, los anticuerpos también pueden dar lugar a reacciones adversas inmunogénicas, en relación con su método de producción⁶⁰.

Por otra parte, es difícil generar anticuerpos contra moléculas tales como fármacos inmunosupresores o toxinas, debido a que estos productos químicos actúan directamente sobre el sistema inmunitario y prevenir su respuesta natural⁹⁴. Por otra parte es bien sabido que las proteínas presentan problemas característicos tales como baja estabilidad y bajo rendimiento en disolventes orgánicos, poca estabilidad en pH ácidos y básicos y a alta temperatura^{95, 96}. Todos estos factores pueden alterar sus propiedades de reconocimiento, lo que acorta su vida útil⁹⁷. Finalmente, las biomoléculas pueden ser difíciles de inmovilizar sobre soportes adecuados para su uso en ensayos y sensores⁹⁸, que es una característica extremadamente importante para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico.

El ensayo de inmunosorción enlazado a enzimas (ELISA) es probablemente uno de los más importantes test en ensayos de diagnóstico⁹⁹⁻¹⁰¹. Una gran cantidad de ensayos de ELISA ha sido desarrollado para testear diferentes analitos, tales como proteínas, drogas, virus y ADN. El test de ELISA puede ser desarrollado en diferentes formatos, los más comunes son el método directo, indirecto, competitivo, en el método directo los anticuerpos o el antígeno son inmovilizados en el microplato utilizado en el test de ELISA, se produce un enlace directo ya sea entre el antígeno anticuerpo o anticuerpo antígeno dando lugar a una señal analítica. En el formato de ensayo indirecto el antígeno es inmovilizado en el microplato, que luego será enlazado a un anticuerpo, subsecuentemente esta especie se enlaza a otro anticuerpo que tiene la capacidad de revelar una señal analítica. En el formato competitivo, los anticuerpos son inmovilizados en los microplatos, y la competencia por enlazarse con los anticuerpos es entre el analito libre y el analito enlazado a una enzima que revela una señal analítica. Sin importar el formato de ELISA que se lleve a cabo, estos ensayos son utilizados en la determinación cuantitativa de distintos analitos mediante una reacción colorimétrica.¹⁰² Las grandes ventajas de este método son una gran sensibilidad al igual que una gran selectividad y una fácil operación en el ensayo, sin embargo este test también cuenta con grandes desventajas dados los altos costos de los anticuerpos y la baja estabilidad de los reactivos involucrados que necesitan todo el tiempo ser refrigerados lo que hace el trabajo de campo más caro y difícil.

Por las razones previamente descritas, en este trabajo de tesis se han obtenido nuevos materiales que presenten propiedades de selectividad hacia la adsorción de diferentes moléculas. En primera instancia se obtuvieron MIPs que presentan selectividad hacia la adsorción de una molécula orgánica presente en los residuos de disparo, como la difenilamina. El segundo objetivo fue desarrollar materiales que remplacen los anticuerpos del test de ELISA, y mejorar en cierto modo las desventajas que los anticuerpos presentan en este test para la detección y cuantificación de biotina y melamina.

En este campo los polímeros impresos molecularmente (MIPs) gracias a su estabilidad, bajo costo y fácil producción pueden ser una alternativa real a los anticuerpos en muchas aplicaciones diferentes, tales como test de diagnóstico, farmacología y biotecnología, entre otros.

El trabajo se realizará de la siguiente manera. La síntesis de MIPs y NIPs será llevada a cabo mediante una polimerización radical en solución, usando diferentes tipos de monómeros. Los MIPs serán sintetizados utilizando una estrategia no covalente. Las variables a estudiar serán la naturaleza del monómero, proporción iniciador/monómero, proporción entrecruzador/monómero, naturaleza de la

plantilla, proporción plantilla/monómero, naturaleza del solvente y proporción monómero/solvente. Las variables serán evaluadas utilizando un análisis multivariado y un diseño experimental con el fin de establecer los factores que afectan la capacidad de adsorción. El mecanismo de adsorción de la molécula DFA será estudiada a través de isothermas de adsorción y estudios cinéticos.

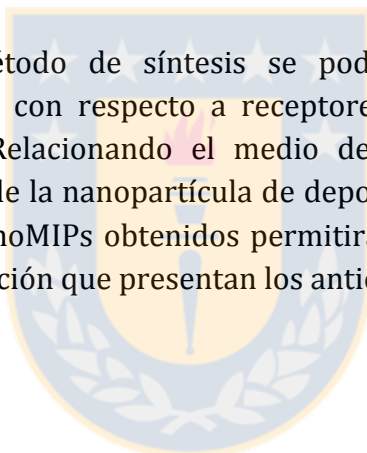
Por otra parte la síntesis de nanoMIPs será llevada a cabo en medio acuoso u orgánico dependiendo del sistema de síntesis y la molécula plantilla a seleccionar, las moléculas plantilla serán biotina y melamina. Las síntesis se iniciarían química o fotoquímicamente dependiendo del modelo de síntesis seleccionado. Para luego ser evaluada la capacidad de adsorción de la biotina y la melamina en el test de ELISA que corresponda.



Las hipótesis que sustentan este trabajo de investigación se describen a continuación

Hipótesis.

1. Interacciones del tipo Van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones electroestáticas sumadas a interacciones más específicas del tipo π - π *stacking* entre los monómeros y las moléculas plantilla generarán sitios de unión más específicos para la adsorción de las moléculas objetivo. La capacidad de adsorción de los MIPs dependerá de las condiciones de síntesis. En este sentido el efecto de las variables se podrá entender y controlar a través de un diseño experimental adecuado.
2. Dependiendo del método de síntesis se podrán obtener nanoMIPs que presenten similitudes con respecto a receptores biológicos en términos de tamaño y afinidad. Relacionando el medio de síntesis utilizado se podrá estimar la capacidad de la nanopartícula de depositarse en los microplatos del test de ELISA. Los nanoMIPs obtenidos permitirán cuantificar analitos dentro de los límites de detección que presentan los anticuerpos en el test de ELISA.



Objetivos Generales.

- 1. Sintetizar resinas de polímeros impresos molecularmente MIPs para la detección y preconcentración de difenilamina.*
- 2. Sintetizar nanoMIPs para remplazar anticuerpos utilizados en el test de ELISA para detectar melamina y biotina"*

Objetivos Específicos.

1. Obtener y caracterizar polímeros impresos molecularmente (MIPs) que presenten selectividad hacia la adsorción de DFA.
2. Obtener y caracterizar nanoMIPs que presenten selectividad hacia biotina y melamina.
3. Evaluar el mecanismo de adsorción del DFA en los correspondientes MIPs.
4. Estudiar la capacidad de deposición de los nanoMIPs en los microplatos del test de ELISA, para luego evaluar la adsorción de biotina y melamina por parte de los nanoMIPs.
5. Valorar resultados y determinar los MIPs que presenten las mejores características para ser utilizados como extractores en fase sólida.
6. Determinar los nanoMIPs que presenten las mejores características para remplazar anticuerpos naturales para detectar biotina y melamina.

Capítulo II Procedimiento Experimental

Materiales y Métodos.

2.1. Materiales y Reactivos

2.1.1. Reactivos utilizados en la síntesis de MIPs y NIPs

- Agua destilada.
- Agua milliQ.
- Agua, grado HPLC, J.T. Baker.
- Etanol absoluto (C_2H_6O), p.a, Merck.
- Etanol (C_2H_6O), grado HPLC, Merck.
- Estireno, 99%, Aldrich.
- Difenilamina, (DFA), 98%, Merck.
- Divinilbenceno, (DVB) 80% mezcla de isómeros, Aldrich.
- 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN).
- Glicerina, 99,5%, USP.
- Metanol (CH_3OH), grado HPLC; J.T.Baker.
- Metanol (CH_3OH), p.a, J.T Baker.
- 1-vinil-2-pirrolidona (VPi), $\geq 99\%$, Aldrich.
- 1-vinilimidazol (VIm), $\geq 99\%$, Aldrich.
- Etilenglicoldimetacrilato (EGDMA), 98%, Aldrich.
- Acrilamida, (AAm) $\geq 99\%$, Aldrich.
- Acetonitrilo, grado HPLC; J.T.Baker.
- Acetonitrilo, p.a, Merck.

2.1.2.Reactivos utilizados en la síntesis de nanoMIPs.

- Biotina, Sigma Aldrich. $\geq 99\%$
- 4-aminofenol, Sigma Aldrich. $\geq 99\%$
- Melamina, Sigma Aldrich. 99%
- Ácido Acrílico (AA), Sigma Aldrich. $\geq 95\%$
- Ácido metaacrílico (AMA), Sigma Aldrich. $\geq 95\%$
- N-isopropilacrilamida (NIPAm), Sigma Aldrich. $\geq 97\%$
- Polietilenglicol (PEG) 1100 MW, Sigma Aldrich.
- N, N'-metilen-bis-acrilamida (BIS), Sigma Aldrich. 99%
- Glutaraldehído (GA), Sigma Aldrich. 50% masa en agua
- N-tertbutilacrilamida (TBAm), Sigma Aldrich. $\geq 97\%$
- Persulfato de amonio (APS), Sigma Aldrich. $\geq 99\%$
- Tetrametiletilendiamina (TEMED), Sigma Aldrich. 99%
- 3-aminopropiltrietoxisilano (APTMS), Sigma Aldrich. 97%
- Pentaeritritol tetraquis (3- mercaptopropionato), (CTA), Sigma Aldrich. $\geq 95\%$
- Éster bencílico del ácido N-dietilditiocarbámico, Sigma Aldrich. $\geq 95\%$
- Hidróxido de sodio (NaOH), Sigma Aldrich. $\geq 98,5\%$
- Albúmina de suero (BSA), Sigma Aldrich . 30% en Buffer DPBS
- horseradish peroxidase (HRP), Sigma Aldrich. $\geq 95\%$
- 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) sustrato líquido para el test de ELISA, Sigma Aldrich. $\geq 95\%$
- Tween 20, Sigma Aldrich. $\geq 40\%$
- dodecil sulfato de sodio (SDS), Sigma Aldrich. $\geq 98,5\%$
- Acetona, grado HPLC.
- Ácido 2-[morfolino] etanosulfónico (MES), Sigma Aldrich. $\geq 98\%$
- N-hidroxisuccinimida (NHS) Sigma Aldrich. $\geq 98\%$
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) Sigma Aldrich. $\geq 98\%$
- Perlas de vidrio 75 μm Sigma Aldrich.
- N-metil-2-irrolidona(NMP), Sigma Aldrich. $\geq 99\%$
- Tampón fosfato salino, pH 7,4, contiene buffer fosfato (0,01 M), cloruro de potasio (0,0027 M) y cloruro sódico (0,137 M) Sigma Aldrich.
- Todos los solventes utilizados fueron grado HPLC o PA.

2.2. Materiales y Equipos.

2.2.1 Polimerización de MIPs y NIPs

- Balanza analítica modelo TE124S, Sartorius.
- Baño Termostático IKA RV 05 basic.
- Agitador recíproco Memmert.
- Bombona de Nitrógeno gas.
- Tubos de centrifuga de 50 mL.
- Globos con Nitrógeno gas.
- Micropipeta de 1000 μ L, BRAND Transferpette®.
- Parafilm; PARAFILM®.
- Pipeta parcial de 10 mL.
- Probeta de 10 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Puntas para micropipeta.
- Vasos precipitados de 50 mL.

2.2.2 Lavado de MIPs.

- Crisol filtrante poro N° 2.
- Matraz Kitasato.
- Piseta con Agua milliQ y Metanol p.a.
- Vaso de precipitado de 200 mL.
- Sistema de filtración al vacío.
- Placas Petri de 90x15 mm.

2.2.3 Tamizado y Molienda de MIPs y NIPs.

- Molino All basic Analytical mill, IKA.
- Mortero.
- Frascos de vidrio con tapa.
- Set de tamices de acero inoxidable de 250, 180 y 100 μ m.

2.2.4 Extracción de la Plantilla en MIPs.

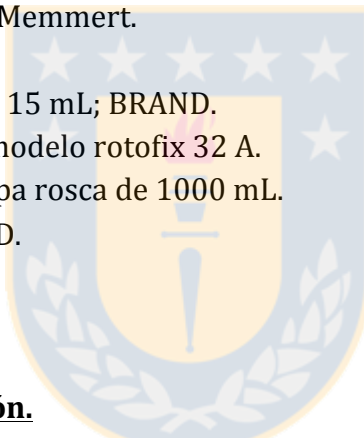
- Vasos de precipitado de 100 y 300 mL.
- Crisol filtrante N°2.
- Matraz de Kitasato.
- Sistema de filtración al vacío.

2.2.5 Retención de DFA por parte de MIPs.

- Agitador recíproco Memmert.
- Balanza analítica modelo TE124S, Sartorius.
- Centrifuga Hettich modelo rotofix 32 A.
- Filtro de membrana PVDF 0,22 μm ; Durapore®.
- Jeringa de 10 mL.
- Matraz aforado de 100 mL.
- Pipeta total de 10 mL.
- Tubos de centrifuga cónico de 15 mL.
- Tubos eppendorf de 1,5 mL; BRAND.
- Frasco de vidrio tapa rosca de 1000 mL.
- Probeta de 100 mL.

2.2.6 Estudios cinéticos en MIPs.

- Balanza analítica modelo TE124S, Sartorius.
- Agitador recíproco Memmert.
- Jeringa de 10 mL.
- Tubos eppendorf de 15 mL; BRAND.
- Centrifuga Hettich modelo rotofix 32 A.
- Frascos de vidrio tapa rosca de 1000 mL.
- Handystep®, BRAND.
- Cronómetro Casio.
- Probeta de 100 mL.



2.2.7 Isotermas de Adsorción.

- Baño termostático con agitación Julabo SW-20C.
- Balanza analítica modelo TE124S, Sartorius.
- Tubos de centrifuga cónicos de 15 mL.
- Tubos eppendorf de 1,5 mL; BRAND.
- Tubos de vidrio tapa rosca de 13x100 mm.
- Handystep®, BRAND.
- Frascos de vidrio rosca de 250, 500 y 1000 mL.
- Probeta de 100 mL.

2.2.8 Caracterización de MIPs y NIPs.

- Espectrofotómetro FT-IR Magna Nicolet 550.
- Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6380 LV.
- Análisis termogravimétrico NETZCH – TGA, TG 209 F1, modelo Iris.

2.2.9 Sistema de preparación de fases sólidas para sintetizar nanoMIPs.

- Set de tamices moleculares ASTM TYLER 8 pulgadas.
- Vibrador para tamices de 8 pulgadas, ROTAP
- Frascos de Vidrio tapa rosca 1000 mL
- Sistema de Filtración al vacío
- Horno mufla Thermolyne
- Balanza analítica modelo TE124S, Sartorius.

2.2.10. Sistema de síntesis de nanoMIPs.

- Balanza analítica modelo TE124S, Sartorius.
- Baño de Ultrasonido VWR International
- Jeringas de Vidrio de 250 mL
- Bombona de nitrógeno
- Tubos Eppendorf 50 mL: Brand.
- Tubos de ultrafiltración 30KDa MWCO: Millipore
- Centrifuga, Thermo Scientific.

2.2.11 Caracterización de nanoMIPs.

- DLS Zetasizer Nano (nano-S): Malvern Instruments
- Microscopio de transmisión electrónica Philips CM20

2.2.12. Preparación de las especies conjugadas Biotina-HRP(HRP-B) y Melamina-HRP(HRP-M).

- Medidor de pH Fisher Scientific
- Vasos pp 50 mL y 500 mL
- Matraces aforados 5 mL, 10 mL y 25 mL
- Balanza analítica, modelo TE124S, Sartorius.
- Centrifuga, Thermo Scientific
- Tubos de ultrafiltración 30KDa MWCO: Millipore

2.2.13. Ensayo competitivo entre Biotina vs HRP-B y Melamina vs HRP-M.

- Microplacas, Nunclon 96 micropocillos, Thermo Scientific.
- Micropipeta multicanal: Brand
- Lector de microplatos UV/visible, EPOCH-BIOTEK

2.3. Metodología de trabajo

2.3.1. Metodología de trabajo en la obtención, caracterización y aplicación de MIPs y NIPs

2.3.1.1. Síntesis de mini-MIPs.

Con el fin de optimizar el proceso de síntesis de MIPs se desarrollan los denominados mini-MIPs siguiendo un diseño experimental específico para cada sistema de polimerización.

Tabla N°3. Estructuras de reactivos a utilizar en la síntesis de MIPs

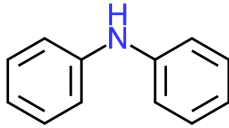
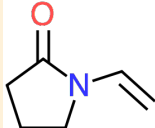
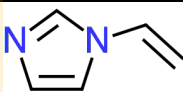
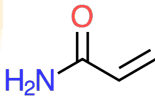
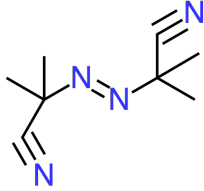
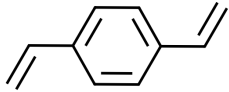
Plantilla	Difenilamina (DFA)	
Monómeros	vinilpirrolidona (VPi)	
	vinilimidazol (VIm)	
	Acrilamida (AAm)	
Iniciador	Azo iso bis butironitrilo (AIBN)	
Entrecruzador	Divinilbenceno (DVB)	

Tabla N°4. Sistemas de síntesis para la molécula objetivo DFA.

	<i>Sistema 1</i>	<i>Sistema 2</i>	<i>Sistema 3</i>
Plantilla	DFA	DFA	DFA
Monómero	vinil-2-pirrolidona	Vinilimidazol	Acrilamida
Entrecruzador	DVB	DVB	DVB
Iniciador	AIBN	AIBN	AIBN
Solvente	EtOH	EtOH	EtOH

El hecho de utilizar un diseño de experimentos permite identificar las variables de la síntesis que más afectan a la respuesta seleccionada (% de rendimiento de los MIPs y % de retención de los MIPs hacia la molécula DFA), y como estas variables interactúan entre sí.

El diseño experimental seleccionado es un diseño factorial simple de compuesto central de $2^k + 3$ siendo k el número de los factores, consecuentemente el número de experimentos distintos por cada sistema que se evaluó resultó ser 19.

Tabla Nº5. Factores que se varían durante la síntesis de MIPs y la cantidad de los factores que se considera mínima y máxima.

Factores	Bajo / -1	Alto / +1
Plantilla	10 mol % en relación al monómero	30 mol % en relación al monómero
Monómero	2 g fijos	2 g fijos
Entrecruzador	50 mol % en relación al monómero	300 mol % en relación al monómero
Iniciador	1 mol % en relación al monómero	3 mol % en relación al monómero
solvente	2 mL	10 mL

Tabla Nº6. Nombre de los experimentos y orden en que se realizan, por otra parte incluye las cantidades de cada variable sintética en cada experimento.

Nombre	Nº DE EXP.	ORDEN	PLANTILLA	ENTRECRUZADOR	INICIADOR	SOLVENTE
miniMIP 1	1	19	-1	-1	-1	-1
miniMIP 2	2	2	+1	-1	-1	-1
miniMIP 3	3	3	-1	+1	-1	-1
miniMIP 4	4	13	+1	+1	-1	-1
miniMIP 5	5	11	-1	-1	+1	-1
miniMIP 6	6	5	+1	-1	+1	-1
miniMIP 7	7	8	-1	+1	+1	-1
miniMIP 8	8	17	+1	+1	+1	-1
miniMIP 9	9	7	-1	-1	-1	+1
miniMIP 10	10	18	+1	-1	-1	+1
miniMIP 11	11	14	-1	+1	-1	+1
miniMIP 12	12	10	+1	+1	-1	+1
miniMIP 13	13	9	-1	-1	+1	+1
miniMIP 14	14	6	+1	-1	+1	+1
miniMIP 15	15	15	-1	+1	+1	+1
miniMIP 16	16	4	+1	+1	+1	+1
miniMIP 17	17	16	0	0	0	0
miniMIP 18	18	12	0	0	0	0
miniMIP 19	19	1	0	0	0	0

En la tabla N°6 se pueden observar las variables de la síntesis, que son la molécula plantilla, el entrecruzador, el iniciador y el solvente. En la primera columna está el número en que se distingue el experimento, en la segunda columna aparece el orden en el que se debe realizar el experimento con el fin de aleatorizar las síntesis y no condicionar las mismas a un error sistemático, en las columnas 4, 5 y 6 se encuentran las respectivas variables sintéticas mencionadas anteriormente, y la cantidad que le corresponde a cada una, ya sea mínima, representada por un -1, máxima representada por un +1 o centrada representada por un 0.

Tabla N°7. Cantidades requeridas de las variables sintéticas de acuerdo al diseño de experimentos para la síntesis de miniMIPs del sistema 1.

sistema 1: vinil-2-pirrolidona, AIBN, DVB, Difenilamina, EtOH						
<i>Nombre</i>	<i>ORDEN</i>	<i>NºEXP</i>	Plantilla (g)	Entrecruzador (mL)	Iniciador (g)	Solvente (mL)
<i>miniMIP 1</i>	1	19	0,61	4,49	0,059	6
<i>miniMIP 2</i>	2	2	0,91	1,28	0,029	2
<i>miniMIP 3</i>	3	3	0,30	7,68	0,029	2
<i>miniMIP 4</i>	4	16	0,91	7,68	0,085	10
<i>miniMIP 5</i>	5	6	0,91	1,28	0,088	2
<i>miniMIP 6</i>	6	14	0,91	7,68	0,029	10
<i>miniMIP 7</i>	7	9	0,30	1,28	0,029	10
<i>miniMIP 8</i>	8	7	0,30	7,68	0,085	2
<i>miniMIP 9</i>	9	13	0,30	7,68	0,029	10
<i>miniMIP 10</i>	10	12	0,91	7,68	0,029	10
<i>miniMIP 11</i>	11	5	0,30	1,28	0,088	2
<i>miniMIP 12</i>	12	18	0,61	4,49	0,059	6
<i>miniMIP 13</i>	13	4	0,91	7,68	0,029	2
<i>miniMIP 14</i>	14	11	0,30	1,28	0,029	10
<i>miniMIP 15</i>	15	15	0,30	7,68	0,085	10
<i>miniMIP 16</i>	16	17	0,61	4,49	0,059	6
<i>miniMIP 17</i>	17	8	0,91	7,68	0,085	2
<i>miniMIP 18</i>	18	10	0,91	1,28	0,029	10
<i>miniMIP 19</i>	19	1	0,30	1,28	0,029	2

Tabla N°8. Cantidades requeridas de las variables sintéticas de acuerdo al diseño de experimentos para la síntesis de miniMIPs del sistema 2.

	sistema 2: vinilimidazol, AIBN, DVB, Difenilamina, EtOH					
<i>Nombre</i>	<i>ORDEN</i>	<i>NºEXP</i>	Plantilla (g)	Entrecruzador (mL)	Iniciador (g)	Solvente (mL)
<i>miniMIP 1</i>	1	19	0,719	5,30	0,07	6
<i>miniMIP 2</i>	2	2	1,08	1,51	0,035	2
<i>miniMIP 3</i>	3	3	0,36	9,08	0,035	2
<i>miniMIP 4</i>	4	16	1,08	9,08	0,105	10
<i>miniMIP 5</i>	5	6	1,08	1,51	0,105	2
<i>miniMIP 6</i>	6	14	1,08	1,51	0,105	2
<i>miniMIP 7</i>	7	9	0,36	1,51	0,035	10
<i>miniMIP 8</i>	8	7	0,36	9,08	0,105	2
<i>miniMIP 9</i>	9	13	0,36	1,51	0,105	10
<i>miniMIP 10</i>	10	12	1,08	9,08	0,035	10
<i>miniMIP 11</i>	11	5	0,36	1,51	0,105	2
<i>miniMIP 12</i>	12	18	0,719	5,30	0,07	6
<i>miniMIP 13</i>	13	4	1,08	9,08	0,035	2
<i>miniMIP 14</i>	14	11	0,36	9,08	0,035	10
<i>miniMIP 15</i>	15	15	0,36	9,08	1,105	10
<i>miniMIP 16</i>	16	17	0,719	5,30	0,07	6
<i>miniMIP 17</i>	17	8	1,08	9,08	0,105	2
<i>miniMIP 18</i>	18	10	1,08	1,51	0,035	10
<i>miniMIP 19</i>	19	1	0,36	1,51	0,035	2

Tabla N°9. Cantidades requeridas de las variables sintéticas de acuerdo al diseño de experimentos para la síntesis de miniMIPs del sistema 3.

	sistema 3: Acrilamida, AIBN, DVB, Difenilamina, EtOH					
<i>Nombre</i>	<i>ORDEN</i>	<i>NºEXP</i>	Plantilla (g)	Entrecruzador (mL)	Iniciador (g)	Solvente (mL)
<i>miniMIP 1</i>	1	19	0,951	7,00	0,092	6
<i>miniMIP 2</i>	2	2	1,43	2,00	0,046	2
<i>miniMIP 3</i>	3	3	0,476	12,00	0,046	2
<i>miniMIP 4</i>	4	16	1,43	12,00	0,138	10
<i>miniMIP 5</i>	5	6	1,43	2,00	0,138	2
<i>miniMIP 6</i>	6	14	1,43	2,00	0,138	10
<i>miniMIP 7</i>	7	9	0,476	2,00	0,046	10
<i>miniMIP 8</i>	8	7	0,476	12,00	0,138	2
<i>miniMIP 9</i>	9	13	0,476	2,00	0,138	10
<i>miniMIP 10</i>	10	12	1,43	12,00	0,046	10
<i>miniMIP 11</i>	11	5	0,476	2,00	0,138	2
<i>miniMIP 12</i>	12	18	0,951	7,00	0,092	6
<i>miniMIP 13</i>	13	4	1,43	12,00	0,046	2
<i>miniMIP 14</i>	14	11	0,476	12,00	0,046	10
<i>miniMIP 15</i>	15	15	0,476	12,00	0,138	10
<i>miniMIP 16</i>	16	17	0,951	7,00	0,092	6
<i>miniMIP 17</i>	17	8	1,43	12,00	0,138	2
<i>miniMIP 18</i>	18	10	1,43	2,00	0,046	10
<i>miniMIP 19</i>	19	1	0,476	2,00	0,046	2

2.3.1.2. Protocolo de la síntesis de mini-MIPs

Se tomó la cantidad requerida de monómero y se llevó a un tubo de polimerización de 50 mL, luego se agregó el solvente porógeno y se agregó la cantidad de plantilla necesaria. La mezcla se agitó durante 5 minutos para obtener una solución homogénea, posterior a la agitación se dejó reposar por 45 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se agregó el volumen necesario de entrecruzador y se agitó durante 5 minutos. Posterior a esto se agregó la cantidad de iniciador requerido, disuelto en la mínima cantidad de solvente. A esta mezcla se le hizo burbujear $N_{2(g)}$ con una pipeta Pasteur por 5 minutos para luego tapar el tubo con un globo inflado con $N_{2(g)}$ para generar una atmósfera inerte. Los tubos fueron llevados a un baño termostático a 70°C por 24 horas. Ver Figura 5.

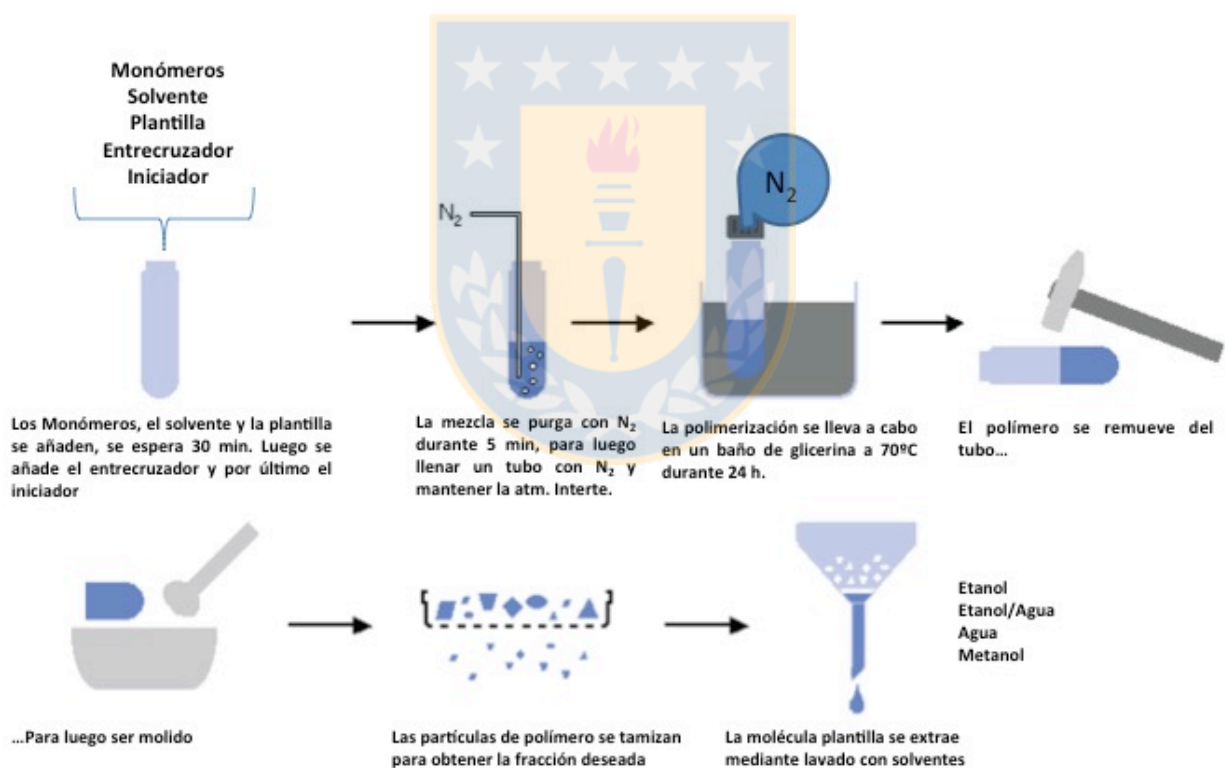


Fig. N°5. Esquema de síntesis que se lleva a cabo para obtener los miniMIPs, y los MIPs.

Una vez obtenidos los mini-MIPs se eligen 3 experimentos que presenten mayor rendimiento y retención por sistema para luego sintetizar MIPs y NIPs en mayor cantidad. Para no generar confusión los experimentos seleccionados son renombrados.

Los experimentos seleccionados y renombrados son:

	Denominación original	Denominación nueva
Sistema 1	miniMIP 15	MIP 1
	miniMIP 16	MIP 2
	miniMIP 18	MIP 3
Sistema 2	miniMIP 6	MIP 4
	miniMIP 8	MIP 5
	miniMIP 1	MIP 6
Sistema 3	miniMIP 18	MIP 7
	miniMIP 14	MIP 8
	miniMIP 1	MIP 9

Tabla N°10. Cantidades requeridas calculadas para las síntesis de MIPs y NIPs.

N° exp	Iniciador (g)	Entrecruzador (mL)	Solvente (mL)	Monómero	Plantilla (g)
MIP 1	0,177	15,4	20	3,92 mL	0,609
MIP 2	0,118	8,97	12	3,92 mL	1,22
MIP 3	0,177	15,4	4	3,92 mL	0,609
MIP 4	0,21	18,2	4	3,85 mL	2,16
MIP 5	0,21	18,2	4	3,85 mL	0,719
MIP 6	0,14	10,6	12	3,85 mL	1,44
MIP 7	0,092	4	20	4,00 g	2,85
MIP 8	0,092	24	4	4,00 g	2,85
MIP 9	0,1844	14	12	4,00 g	1,91

La síntesis de NIPs se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo de polimerización y utilizando las mismas cantidades de reactivo pero sin la presencia de plantilla.

2.3.1.3. Lavado de MIPs y NIPs.

Se retiró la resina del tubo de polimerización y se llevó a un crisol filtrante acoplado a un sistema de filtración al vacío, para luego proceder a lavar el polímero con 300 mL de metanol y 200 mL de agua milliQ. Luego de ser lavada la resina fue llevada a una placa Petri y se introdujo en la estufa a 40°C hasta llegar a peso constante.

2.3.1.4. Extracción de la plantilla en MIPs.

La extracción de la plantilla se realizó con los MIPs ya secos. Éstos son llevados a un vaso de precipitado de 250 mL, al que se agregó 150 mL de metanol, se agitó por unos minutos y se dejó en reposo por una hora. Se repitió el procedimiento 5 veces. Luego de esto la resina se llevó a un crisol filtrante acoplado a un sistema de filtración al vacío se filtró y se llevó a una cápsula Petri para posteriormente llevar la resina a la estufa a 40°C hasta llegar a peso constante.

2.3.1.5. Molienda y tamizado de MIPs y NIPs.

Este procedimiento se realizó para los polímeros sintetizados en mayor cantidad. Una vez secos los polímeros se procedió a tamizar utilizando tamices de tamaño de partícula de 250, 180 y 100 μm . Para todos los estudios se utilizó la fracción de tamaño de partícula de 180 μm . La resina que queda en la fracción superior a 180 μm se lleva a un molino para así obtener resina de la fracción deseada.

2.3.1.6. Implementación de metodología analítica para identificar y cuantificar difenilamina.

Se realizaron barridos de longitudes de onda en el espectrofotómetro UV visible con el fin de determinar la máxima absorción de luz que presenta la DFA en una solución 50:50 etanol-agua. El máximo de absorción está en 284 nm. Por ende ésta es la longitud de onda seleccionada. Posteriormente se procede a hacer una curva de calibración con patrones de 1,2 a 20 mgL^{-1} de DFA en una mezcla 50:50 etanol-agua.

2.3.1.7. Estudios de retención para MIPs y NIPs.

A un tubo de centrífuga de 15 mL se agregó 100 mgL⁻¹ de MIP o NIP y 10 mL de solución estándar de 100 mg L⁻¹ de difenilamina. Esta mezcla se agitó por una hora en un agitador recíproco. Luego se centrifugó por 10 minutos y el líquido sobrenadante se filtró con filtro de membrana de PVDF 0,22 µm y se llevó a tubos eppendorf. Para luego ser medida su absorción mediante espectrofotometría de absorción UV. Ver figura 6.

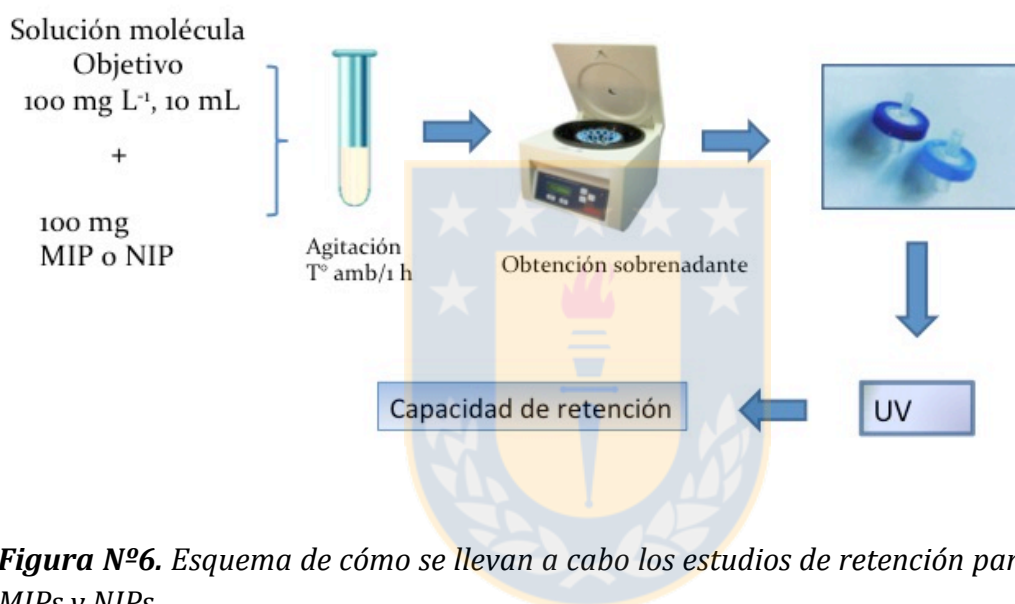


Figura N°6. Esquema de cómo se llevan a cabo los estudios de retención para miniMIPs, MIPs y NIPs.

1

2.3.1.8. Estudios de la cinética de retención en MIPs y NIPs.

Con el fin de medir la capacidad de adsorción a diferentes tiempos de contacto se agregó a un tubo centrífuga de 15 mL 100 mg de MIP y 10 mL de solución estándar de 100 mgL⁻¹ de difenilamina. Para cada polímero se prepararon 7 tubos iguales. Los tubos se llevaron a un agitador recíproco retirando los tubos a 0, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 y 100 minutos de comenzado el contacto. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente el tubo fue llevado rápidamente a la centrífuga por 5 minutos y el líquido sobrenadante se filtró con filtro de membrana de PVDF 0,22 µm para ser llevado a un tubo eppendorf. Este procedimiento se realizó también para los NIPs.

2.3.1.9. Isotermas de adsorción de DFA en MIPs y NIPs.

Se realizó con 8 concentraciones distintas de difenilamina de 100 a 5000 mgL⁻¹ y a 4 diferentes temperaturas 25, 30, 35 y 40 °C. Para ello a 8 tubos de centrífuga de 15 mL se agregaron 50 mg de MIP y 10 mL del estándar de la concentración correspondiente. Luego fueron llevados a un baño termostático con agitación por 24 h a una velocidad de 140 rpm a la temperatura correspondiente.

Una vez terminado el proceso se retiraron los tubos y fueron centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante es llevado a un tubo eppendorf para posteriormente medir la concentración de DFA en equilibrio mediante espectroscopia UV-VIS.



2.3.2. Metodología de trabajo para la obtención caracterización y uso de nanoMIPs

2.3.2.1.Preparación de fases sólidas con biotina y melamina.

El protocolo de preparación de fases sólidas para inmovilizar moléculas plantillas ha sido adaptado de Poma y col.⁷³ Las esferas de vidrio son activadas con NaOH [1molL^{-1}], esta solución se lleva a ebullición durante 10 min, las esferas luego son lavadas con agua desionizada en un equipo de filtración al vacío, 5 veces, para luego ser una vez lavadas con acetona. Posteriormente el material se seca en una estufa a 80°C durante 2 horas. Subsiguientemente las esferas son incubadas en una solución de APTMS (2 % v/v) en tolueno seco durante 12 hrs. Luego las esferas de vidrio son lavadas con acetona y secadas para su posterior utilización en la obtención de perlas de vidrio-biotina y perlas de vidrio-melamina.

Para llevar a cabo la inmovilización de la molécula plantilla melamina (figura 7a) se siguió el protocolo dispuesto por Chianella y col¹⁰³. Después de incubar las esferas de vidrio con un 2 % v/v de APTMS en tolueno seco. Las esferas de vidrio son incubadas durante 2 horas a 25°C en una solución de glutaraldehído (5 % V/V) en buffer fosfato pH 7.2, luego las esferas de vidrio son lavadas con agua destilada en un sistema de filtración al vacío en repetidas ocasiones. Posteriormente se pone en contacto las esferas de vidrio recién obtenidas con melamina en una relación de $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en buffer fosfato a pH 7.2, a demás hay que agregar un 10% de N-metil-2-pirrolidona para disolver la melamina, durante 12 hrs. Por último las esferas de vidrio modificadas con melamina son lavadas con agua desionizada en un sistema de filtración al vacío, luego secadas, y posteriormente guardadas a 4°C para su posterior utilización.

Para la inmovilización de la molécula plantilla biotina (Figura 7b) se toman 25 mg de biotina y se activa con EDC/NHS (250mg/375mg) a pH 6 en 50 mL de buffer fosfato durante 15 minutos, posteriormente la biotina activada se mezcla con las perlas de vidrio a pH 7,4 durante 12 h. Finalmente las esferas de vidrio modificadas con biotina son lavadas con agua desionizada en un sistema de filtración al vacío, luego secadas, y posteriormente guardadas a 4°C para su posterior utilización.

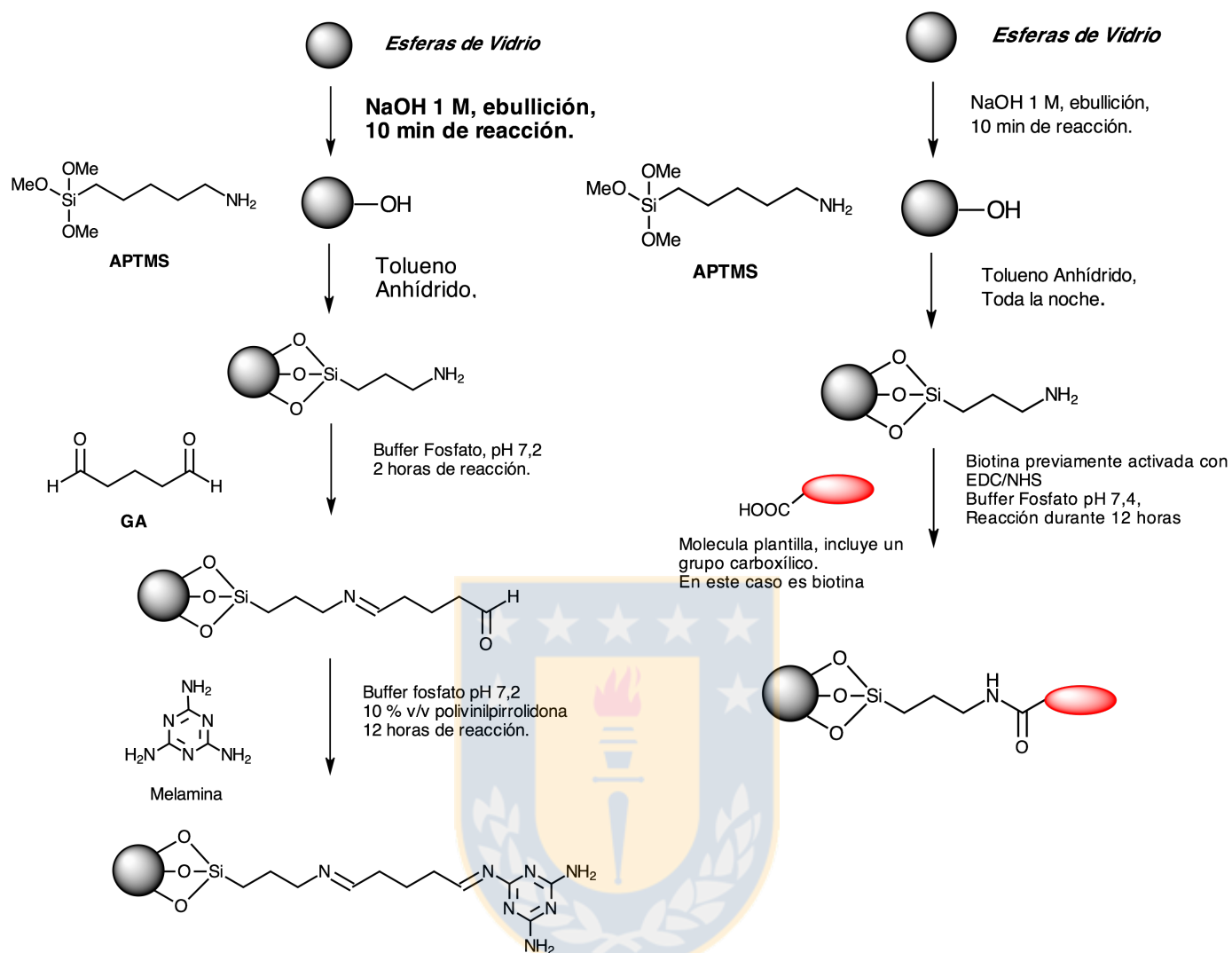


Figura N°7. A) Protocolo de síntesis para la inmovilización de melamina en las esferas de vidrio. **B)** Protocolo de síntesis para la inmovilización de biotina en las esferas de vidrio.

2.3.2.2. Síntesis de nanoMIPs para biotina y melamina en agua, mediante polimerización química.

La síntesis de nanoMIPs para biotina y melamina en agua fue realizada bajo el mismo método que se describe a continuación (ver figura 8). Se mezclaron NIPAM (39 mg), BIS (2 mg), TBAm (33 mg disuelto en 2 mL de etanol), y AA (2,23 g), en 100 mL de agua tipo I. La solución fue sonicada durante 10 minutos, y luego desgasificada con nitrógeno durante 30 minutos. Luego se añadieron 60 g de esferas de vidrio funcionalizadas con biotina o melamina, la mezcla se agitó brevemente para homogeneizar la disolución. La mezcla se desgasificó nuevamente con nitrógeno, luego se inició la polimerización añadiendo la mezcla de iniciación de la reacción, 600 μL de persulfato de amonio (APS) (60 mg mL^{-1}) y 18 μL de TEMED. La polimerización se llevó a cabo durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Antes de recolectar las nanopartículas que presentarán elevada afinidad se llevó a cabo un lavado de la fase sólida con el fin de remover los monómeros que no reaccionaron y los nanoMIPs de baja afinidad, utilizando agua tipo I, a 0°C (60 mL durante 8 oportunidades). Las nanopartículas de elevada afinidad fueron recolectadas utilizando agua tipo I a 60°C (60 mL durante 5 oportunidades). Luego la solución de nanoMIPs se filtró en un equipo de filtración milipore Amicon en centrífuga (30 KDa MWCO).

2.3.2.3 Síntesis de nanoMIPs para melamina en acetonitrilo con y sin recubrimiento de PEG, mediante polimerización vía UV.

La mezcla de reacción para la síntesis de nanoMIPs para melamina con recubrimiento de PEG, fue adaptada de Guerreiro y col¹⁰⁴. (ver figura 8). La mezcla de polimerización consistió en 1,44 g de AMM, 1,62 g de TRIM y 1,62 g de EGDMA, 0,377 g de N-éster bencílico del ácido N-dietilditiocarbámico y 3,51 g de acetonitrilo luego la mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 20 minutos. Posteriormente 30 g de esferas de vidrio funcionalizadas con melamina se depositaron en una placa Petri de vidrio donde fueron contactadas con la mezcla de reacción. La nueva disolución fue purgada con nitrógeno durante 5 minutos, para luego llevar a cabo la polimerización por UV durante 1,5 minutos. Después de la polimerización el contenido de la placa Petri se transfirió a un *catridge* de separación en fase sólida con una frita de polietileno y puesto a baño María con hielo a 0°C durante 10 minutos, luego se realizaron procesos de lavado con ACN a 0°C (60 mL durante 8 oportunidades) para remover los monómeros no polimerizados, y las nanopartículas que presenten una baja afinidad. Luego de este paso se lleva a cabo la post-modificación de nanoMIPs con PEG, esta fue llevada a cabo utilizando los nanoMIPs aun enlazados a las perlas de vidrio. Para llevar a cabo este propósito, fue disuelto polietilenglicol (75 mg,

MW=11000) en 8 mL de ACN, luego se desgasificó con nitrógeno durante 10 minutos. Esta solución se añadió luego a las perlas de vidrio enlazadas con los nanoMIPs, posteriormente la nueva disolución se desgasificó con nitrógeno durante 5 minutos, para luego ser llevada a cabo la polimerización del PEG sobre las nanopartículas mediante luz UV durante 1,5 min. Luego de la polimerización las esferas de vidrio enlazadas a las nanopartículas recubiertas con PEG fueron lavadas con ACN a 25 °C (60 mL durante 8 oportunidades) para extraer los monómeros no polimerizados, subsecuentemente el sistema fue lavado con ACN a 60°C (30 mL durante 5 oportunidades) para colectar los nanoMIPs con un alto grado de afinidad. El volumen total de nanoMIPs con un elevado grado de afinidad fue de alrededor 120 mL.

Para obtener los nanoMIPs para melamina sin el recubrimiento de PEG el procedimiento fue exactamente el mismo, solo que sin la post-modificación, los nanoMIPs de alta afinidad fueron obtenidos inmediatamente después de lavar con ACN a 0°C, mediante lavado con ACN a 60°C (30 mL durante 5 oportunidades).

En el paso final de la síntesis para nanoMIPs para melamina en medio orgánico con y sin PEG se toma la fracción de nanoMIPs eluida en ACN en caliente y se intercambia el solvente por agua, utilizando filtros de centrífuga amicon (30 kDa, MWCO). Este procedimiento se realizó debido a la incompatibilidad que se presenta entre los solventes orgánicos y los microplatos que se utilizan en el test de ELISA. Para intercambiar el solvente se toman 20 mL de nanoMIPs eluidos en ACN, se concentran por evaporación hasta obtener 3 mL. Seguidamente 10 mL de agua son añadidos a un filtro de centrífuga amicon (30kDa, MWCO), seguido de 1 mL de nanoMIPs para melamina en ACN. El filtro fue centrifugado a 3500 RPM durante 3 minutos. Luego de realizar el mismo procedimiento para los 3 mL de nanoMIPs, 14 mL fueron añadidos 4 veces al tubo de centrifuga para intercambiar el solvente de ACN a agua. De esta forma se obtuvo nanoMIPs disueltos en agua para poder utilizarlos en los microplatos del test de ELISA.

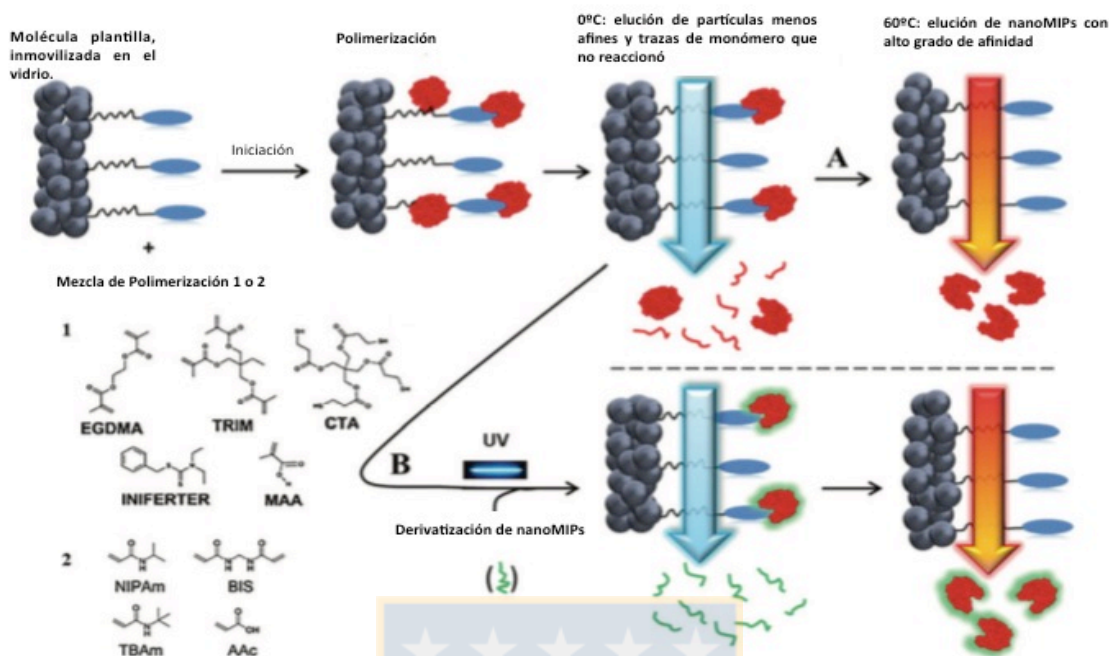


Figura N°8. Esquema de síntesis para la obtención de: nanoMIP sin derivatizar (A) y nanoMIPs derivatizados con PEG (B). La mezcla de polimerización para la obtención de nanoMIPs en medio orgánico es la número 1, la mezcla de síntesis para la obtención de nanoMIPs en medio acuoso es la número 2 (Adaptado de César Cáceres y col.,¹⁰⁵).

2.3.2.4. Caracterización de nanoMIPs

El tamaño de todas los nanoMIPs fue determinado mediante light scattering dinámico (DLS) utilizando un Zetasizer Nano, de Malvern Instruments LTDA. Para confirmar el tamaño de los nanoMIPs también se utilizó la técnica de microscopía de transmisión electrónica (TEM) empleando un microscopio Philips CM20. Antes de realizar DLS o TEM la muestra fue sonicada durante 3 minutos con el fin de destruir posibles agregados de nanoMIPs. Para realizar las mediciones de DLS se tomó una alícuota de 1 mL para ser analizada a 25°C en una cubeta de poliestireno de 3 cm³. Para el análisis de TEM una gota de solución de nanoMIP fue depositada y evaporada en la grilla de análisis de carbón-cobre del equipo.

2.3.2.5. Preparación de biotina conjugada con HRP.

Una solución de stock de biotina (1 mL, 0,2 mg mL⁻¹) se preparó en buffer MES 0.1 molL⁻¹ a pH 6, luego se añadió a la disolución EDC (17,7 µL desde una solución stock de 10 mg mL⁻¹ en agua), posteriormente también se añadió a la disolución NHS (1,72 mg). La reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 15 minutos. Luego a la solución se le

añadió 20 mL de una solución de HRP ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) en buffer fosfato a pH 7,4 y la mezcla fue incubada durante 2 horas. Luego el conjugado HRP-biotina (HRP-B) se lavó en una unidad de filtración Millipore Amicon (30 kDa, MWCO) para extraer cualquier residuo de biotina libre. Este lavado se realizó 10 veces utilizando 5 mL de buffer fosfato. Luego del lavado mencionado el conjugado que quedó en el tubo centrifuga fue disuelto en 2 mL de agua tipo I. Posteriormente se guardó a -18°C para usos futuros en el test de ELISA.

2.3.2.6. Preparación de melamina conjugada con HRP.

Para preparar esta especie se tomó 10 mg de HRP se disolvió en buffer MES pH 6 (1 mL) y luego se añadió EDC (0,4 mg) seguido de NHS (0,6 mg). La reacción se llevó a cabo a 25°C , durante 15 minutos. En este punto el buffer fue extraído por ultrafiltración con una unidad de filtración centrífuga Millipore Amicon (30 kDa, MWCO). El HRP activado se recolectó desde la unidad de ultrafiltración, e inmediatamente incubado con melamina (10 mL , 1 mg mL^{-1}) en buffer fosfato a pH 7,4 durante 2 horas. El conjugado de HRP-melamina (HRP-M) posteriormente se lavó para remover cualquier traza de melamina que no reaccionó, mediante un sistema de filtración Millipore Amicon (30kDa, MWCO), para llevar a cabo este procedimiento se lavó 10 veces con buffer fosfato pH 7.4 (5 mL). Luego de lavado, el conjugado HRP-M se disolvió en 2 mL de agua tipo I. Posteriormente se guardó a -18°C para usos futuros en el test de ELISA.

2.3.2.7. Inmovilización de los nanoMIPs en los microplatos del test de ELISA.

La inmovilización de los nanoMIPs en los microplatos del test de ELISA se llevó a cabo mediante simple deposición y evaporación de los nanoMIPs. Se depositaron $50 \mu\text{L}$ de una solución de nanoMIPs de concentración 0.056 mg mL^{-1} , en los pequeños microplatos que se utilizan como soporte del test de ELISA, después de ser depositados se esperó la evaporación del solvente durante 12 horas a 25°C en oscuridad total. (ver Figura 9)

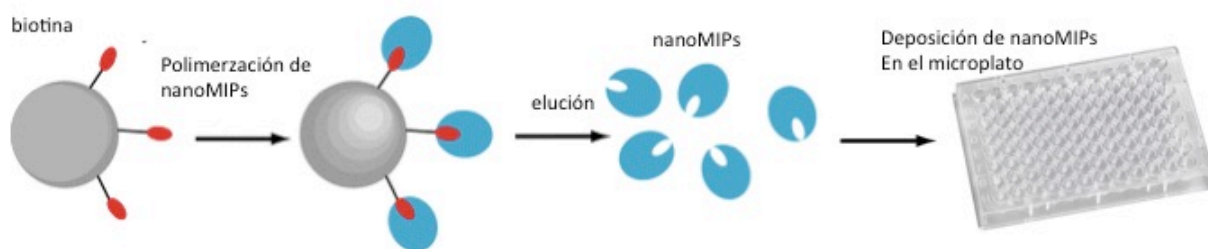


Figura N°9. Esquema de inmovilización de nanoMIPs en los microplatos del test de ELISA.

2.3.2.8. Condiciones de análisis en el test de ELISA.

Varios parámetros como la composición de las condiciones de bloqueo de las paredes de los microplatos, el tiempo y las condiciones de lavado de las paredes de los microplatos, la cantidad de nanoMIPs depositados, el tiempo de incubación y la concentración de HRP-Conjugado, se adoptaron del protocolo utilizado por Chianella y col¹⁰³. (ver figura 10). El procedimiento óptimo se describe a continuación.

- Cada microplato fue condicionado por lavado con buffer PBS pH 7,4 (2x250 μ L), seguido por el bloqueo de las paredes, con 300 μ L de PBS pH 7,4 que contiene 0,1% de BSA y 1 % de tween 20 durante 1 hora.
- Cada microplato fue lavado con buffer PBS pH 7,4 (3 x 250 μ L).
- Posteriormente se adicionó a cada microplato una solución de HRP-B o HRP-M según correspondiese (100 μ L, la concentración de la disolución es 1:800 veces el stock original, paso 3.4.2.5 y 3.4.2.6) y analito libre biotina o melamina según correspondiese en un rango de concentración que va desde los 0,001 a 6000 nmolL⁻¹. Los microplatos fueron incubados con estas dos soluciones durante 1 hora a oscuridad total a 25°C.
- Luego cada microplato fue lavado con buffer fosfato pH 7,4 (3 x 300 μ L) que contenía un 0,1 % de BSA y un 1 % de Tween 20.
- Posteriormente se añadió a cada microplato el agente revelador del test de ELISA TMB (100 μ L), para ser incubado durante 10 minutos. La reacción enzimática se detuvo.
- Consecutivamente se añadió a cada microplato el agente revelador del test de ELISA TMB (100 μ L), para ser incubado durante 10 minutos. La reacción enzimática fue entonces detenida añadiendo una solución de H₂SO₄ (0,5 M, 100 μ L). Luego la absorbancia de cada microplato se midió a 450 nm en un lector de microplatos.

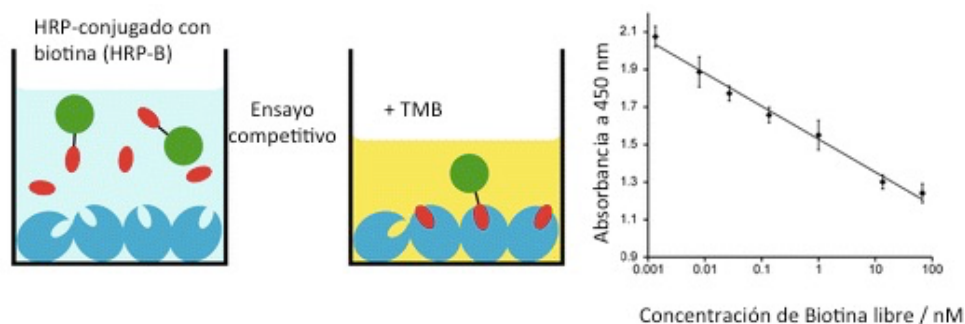


Figura N°10. Análisis competitivo de pseudo ELISA para detectar y cuantificar biotina y melamina.

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

3.1. Rendimiento de Polímeros

La polimerización radicalaria es el método sintético más utilizado disponible en la actualidad para la conversión de monómero en polímero. Es el método más utilizado para la síntesis de polímeros impresos molecularmente debido a que puede realizarse bajo condiciones moderadas de reacción y los monómeros utilizados son de bajo costo, entre otras cosas.

El mecanismo de polimerización radical se caracteriza por tres fases distintas:

Iniciación: Formación de radicales. Ocurre la reacción radical-monómero, donde el radical se adiciona al monómero en su doble enlace, generando un nuevo radical.



Propagación: reacción en cadena. El monómero crece en una reacción en cadena generando cada vez un nuevo radical y aumentando su tamaño molecular.



Término: Las reacciones de término estabilizan al radical en moléculas neutras. Las más comunes son las reacciones de combinación y la de desproporcionamiento, siendo ambas bimoleculares.



3.2. Síntesis de mini-MIPs.

A continuación se presentan los rendimientos en masa de la síntesis de miniMIPs hechas para los sistemas 1, 2 y 3.



Figura N°11. Rendimiento de las síntesis de miniMIPs correspondientes al sistema N°1.

En la figura 11 se observa el rendimiento para cada una de las síntesis de miniMIPs del sistema 1. La diferencia en las cantidades de reactantes para cada experimento se detalla en la tabla N°8. Se puede observar que los miniMIPs 8 y 15 son los que presentan el mayor porcentaje de rendimiento, cercano al 100 % en ambos casos, la cantidad de plantilla (10 mol %), entrecruzador (300 mol %) e iniciador (3 mol %) son las mismas, diferenciándose solamente en la cantidad de solvente utilizado. Otro aspecto importante que se desprende de este sistema de síntesis es la reproducibilidad que se observa, los miniMIPs 1, 12 y 16 son repeticiones del mismo experimento, -en este diseño de síntesis se utilizan repeticiones para observar la reproducibilidad y la variación que hay en un sistema de síntesis- los porcentajes de rendimiento son 67,62 %, 77,98 % y 76,13 % respectivamente. Con un coeficiente de variación del 7,47%.

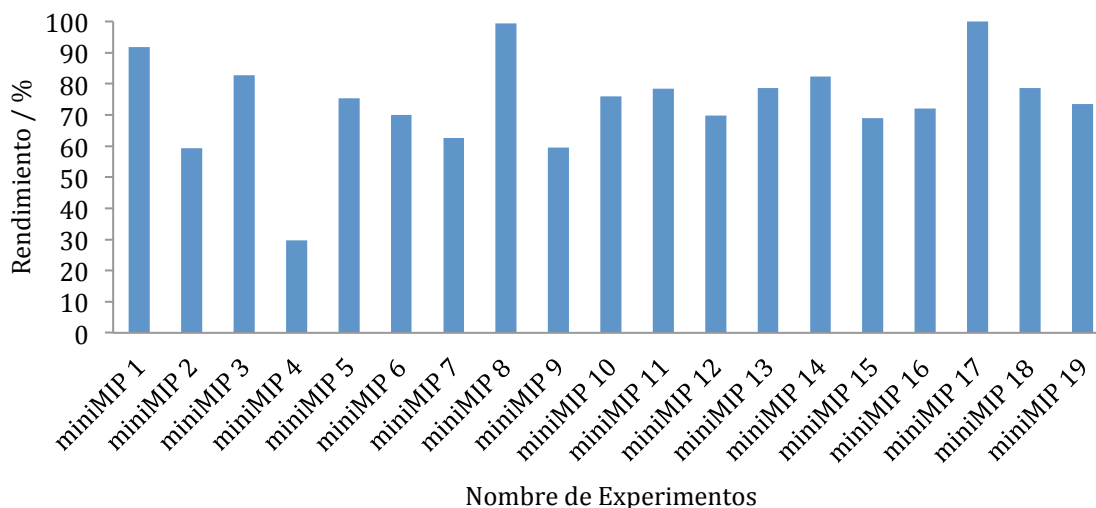


Figura N°12. Rendimiento de las síntesis de miniMIPs correspondientes al sistema N°2.

En la Figura 12 se puede observar el porcentaje de rendimiento para las síntesis de los 19 miniMIPs del sistema 2. El máximo de rendimiento se alcanza en los miniMIPs 17 y 8 con 99,12 y un 99,41 % respectivamente y la característica en común que presentan estos dos sistemas es que tienen la mínima cantidad de solvente (2 mL), por lo que se puede inferir que al tener un volumen de reacción menor la mezcla tenderá a tener más choques efectivos y se producirá el denominado efecto gel, por lo que la cinética de la reacción se favorecería, conllevando esto a un aumento de los rendimientos de las síntesis. Por otra parte se observa que hay un mínimo de rendimiento en este sistema, este mínimo corresponde al miniMIP denominado 4, este miniMIP se caracteriza por tener una elevada cantidad de entrecruzador 300 mol%, y una elevada cantidad de molécula plantilla 30 mol%. El bajo porcentaje de rendimiento se puede explicar debido a que, tanto la molécula plantilla (DFA) como el entrecruzador (DVB) tienen sistemas π conjugados que inhiben la propagación de radicales libres, por lo que habría una menor cantidad de sitios de iniciación de la síntesis. Otro efecto al que se le puede atribuir el bajo rendimiento de la síntesis es el hecho de que al haber una mayor cantidad de moléculas de entrecruzador, los radicales libres de la iniciación se tienen que distribuir entre una mayor cantidad de sitios disponibles para comenzar una reacción de polimerización en cadena, por esto se espera una terminación de la síntesis más rápida, y en general un menor rendimiento de las síntesis. Una de las características más importantes que se desprende de este sistema de síntesis es su reproducibilidad, cuando se calcula el coeficiente de variación para los miniMIPs 1, 12 y 16, se encuentra que es un 2,27 %.

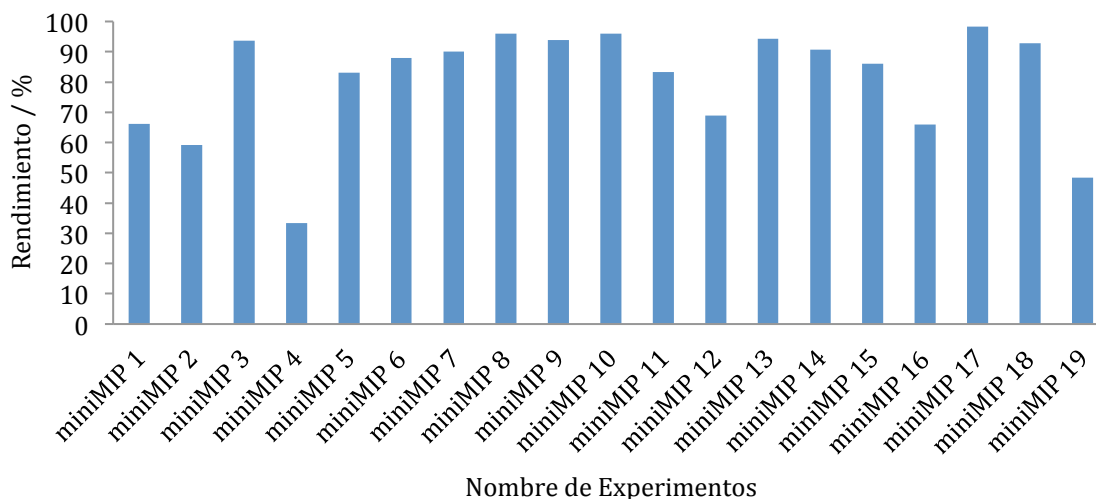


Figura N°13. Rendimiento de las síntesis de miniMIPs correspondientes al sistema N°3.

Evaluando las síntesis de los 19 miniMIPs del sistema 3 ver figura 13 (acrilamida como monómero) es interesante el elevado porcentaje de rendimiento que se observa en al menos 5 experimentos, ya que éstos están cerca del 100 % de rendimiento, -lo que es un resultado esperable para una polimerización radical en solución- en este sistema de síntesis el monómero no presenta sistemas π conjugados por lo que no debiese inhibir la polimerización radical, lo que podría explicar el elevado rendimiento de este sistema. Por otra parte se puede observar que el mínimo de rendimiento está en el miniMIP 4 con un 33,34%. El coeficiente de variación calculado para este sistema es 2,48 %.

En general, al analizar los sistemas estudiados, se puede concluir que a mayor cantidad de entrecruzador se obtiene un mayor rendimiento de la polimerización. Esto se puede atribuir a que al agregar mayor agente entrecruzante se generan resinas con mayor reticulación lo que provoca una mayor rigidez de estos polímeros evitando así la posible solubilización de la resina recién formada en el mismo solvente de síntesis.

Con el fin de estudiar la influencia de los parámetros iniciador y entrecruzador en el rendimiento se procede a representar gráficamente la influencia de estos parámetros, lo que se muestra a continuación.

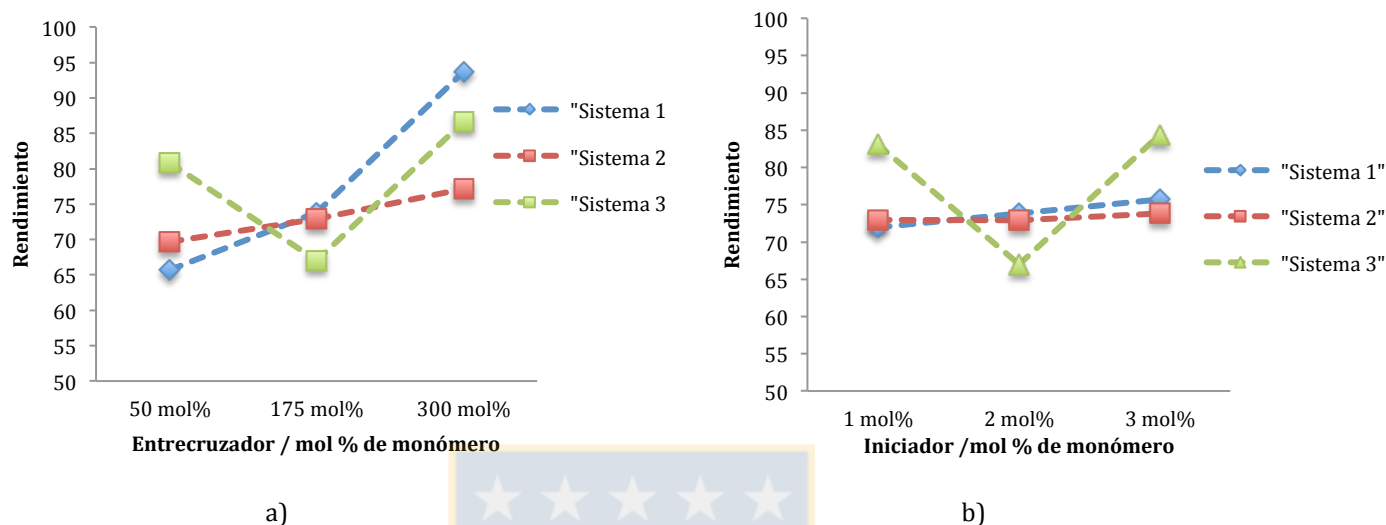


Figura N°14. Efecto de las variables (a) iniciador y (b) entrecruzador sobre el rendimiento de los miniMIPs para el sistema 1, 2 y 3.

Al evaluar la figura. 14a se puede apreciar cómo varía el rendimiento de la síntesis de miniMIPs frente a la cantidad de entrecruzador. Se observa que el entrecruzador es una variable significativa e influye de una manera importante en el rendimiento: para los experimentos del sistema 1 y 2 se advierte que a medida que el entrecruzador aumenta el porcentaje de rendimiento aumenta. Por otra parte se observa que el sistema 3 presenta un mínimo de rendimiento en los valores intermedios de entrecruzador. Esta tendencia se estudiará en profundidad durante el análisis del diseño de experimentos.

En la figura 14b se aprecia cómo varía el rendimiento de las síntesis de miniMIPs frente a la cantidad de iniciador, a diferencia del caso anterior, la cantidad de iniciador en las síntesis de miniMIPs no es una variable significativa, tanto para el sistema 1 y el sistema 2 ya que no se observa ninguna diferencia en el rendimiento.

Por último como se ha mencionado anteriormente la cantidad de entrecruzador influye considerablemente en el rendimiento de los MIPs.

Evaluando las figuras 10, 11 y 12 se puede apreciar que la cantidad de entrecruzador es el factor más importante en el rendimiento de la síntesis de los miniMIPs. Así, a

medida que aumenta la cantidad de entrecruzador, el rendimiento de las síntesis de MIPs también aumenta. Mientras que para cantidades de entrecruzador menores, el rendimiento de la síntesis en general alcanza sus valores más bajos.

3.3. Rendimiento de MIPs y NIPs seleccionados.

En la tabla N°11 se muestran los rendimientos obtenidos para los polímeros seleccionados. Como se mencionó en el apartado 2.3.1.2 se seleccionaron los mejores 3 miniMIPs de cada uno de los sistemas, dando un total de 9 MIPs, con los que se hicieron todas las pruebas restantes. Para tener un control, se sintetizaron los blancos respectivos de los 9 MIPs, denominados NIPs (siguen el mismo protocolo de síntesis, pero no se agrega la molécula plantilla durante la síntesis), es decir, se sintetizaron 18 nuevos polímeros en mayor cantidad para realizar los análisis restantes. El porcentaje de rendimiento de los polímeros fue calculado a partir de la masa total.

Tabla N°11. Rendimiento para MIPs y NIPs seleccionados de cada sistema.

Nombre polímero	Masa teórica (g)	Masa experimental (g)	Rendimiento (%)
MIP 1	18,93	13,60	71,84
NIP 1	18,32	13,50	73,67
MIP 2	13,66	8,99	66,05
NIP 2	12,40	8,17	65,87
MIP 3	18,93	12,58	66,43
NIP 3	18,31	15,09	82,43
MIP 4	22,96	17,91	78,01
NIP 4	20,81	16,80	80,75
MIP 5	27,53	18,64	67,74
NIP 5	20,82	18,32	88,00
MIP 6	15,26	9,98	65,40
NIP 6	13,33	10,43	78,21
MIP 7	10,62	8,64	81,36
NIP 7	7,75	7,29	94,05
MIP 8	28,88	21,51	74,48
NIP 8	26,05	22,28	85,56
MIP 9	18,88	17,88	94,70
MIP 9	17,01	16,95	99,65

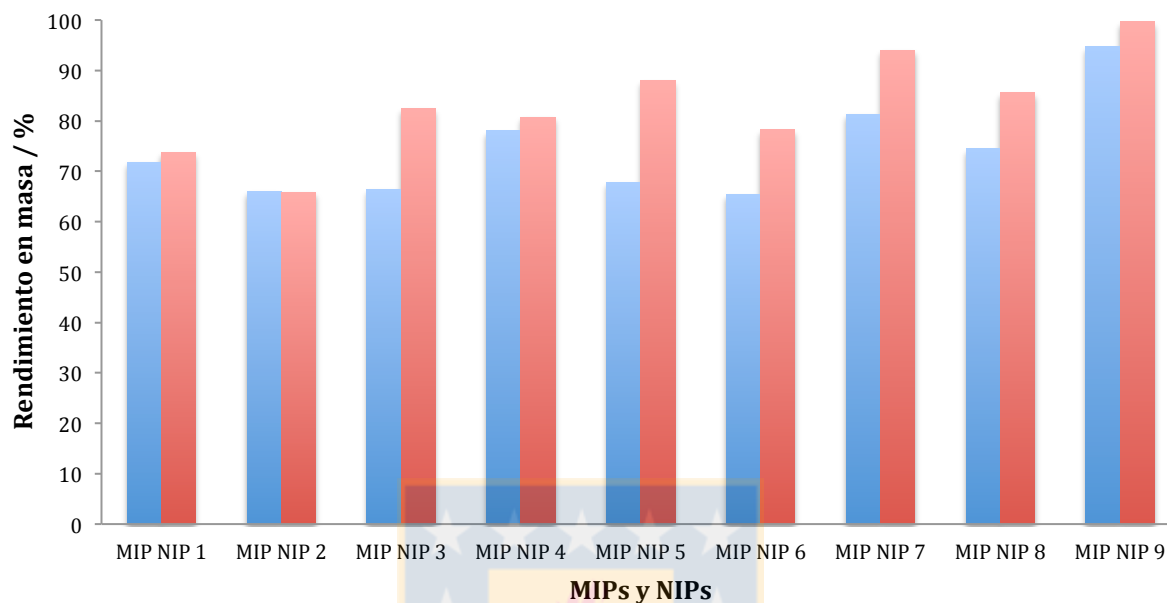


Figura N°15. Rendimiento para MIPs y NIPs seleccionados.

Como se puede observar en la figura 15, en los tres sistemas sintetizados hay un denominador común, los NIPs tienen un mayor rendimiento que los MIPs. El hecho de no utilizar DFA en las síntesis hace que la polimerización sea más efectiva, debido a que la DFA tiene grupos *pi conjugados* que inhiben la propagación de radicales libres; el hecho de no incluirla en la polimerización podría que esta sea más efectiva.

La tabla N°11 muestra el porcentaje de rendimiento para los MIPs y NIPs sintetizados. Para el caso de los MIPs se pueden apreciar diferencias en este valor comparados con los valores de mini-MIPs como por ejemplo el miniMIP 15 se observa un valor de rendimiento cercano al 100%, su equivalente en MIPs es el MIP 1 que presenta un rendimiento de un 71%. Algo similar ocurre entre el miniMIP 8 y su análogo el MIP 3. Esta tendencia se repite en todos los experimentos, el rendimiento fue más adecuado en los miniMIPs que en los MIPs a pesar de solo aumentar proporcionalmente las cantidades agregadas. Esto puede deberse a pequeñas diferencias que se dan entre sintetizar miniMIPs y MIPs. Aunque las condiciones de síntesis son las mismas. El aumentar las cantidades de reactivos puede generar una disminución de la temperatura en el seno de la reacción, lo que se puede traducir en una menor cantidad de radicales libres generados durante el proceso de iniciación de la síntesis y una

menor cantidad de radicales libres significaría una menor cantidad de sitios de iniciación de la síntesis, lo que conllevaría a un menor rendimiento en la síntesis

Por otra parte otro factor que puede influir en esta diferencia es el desfase de tiempo entre la síntesis de los mini-MIPs y los MIPs. Este desfase puede afectar la calidad de los reactivos utilizados, ya que las propiedades de estos reactivos pueden verse levemente afectadas al estar en contacto con el ambiente.

Los polímeros obtenidos durante este paso serán caracterizados, mediante espectroscopia FT-IR, TGA y microscopía electrónica de barrido. Para posteriormente ser utilizados en las distintas pruebas de reconocimiento molecular y adsorción de analitos desde matrices acuosas.



3.4. CARACTERIZACIÓN DE MIPs.

3.4.1 Espectroscopía Infrarroja (FT-IR)

La espectroscopía de absorción es la medición de la cantidad de luz absorbida por un compuesto en función de la longitud de onda de la luz. La espectroscopia infrarroja observa las vibraciones de los enlaces y proporciona evidencia de los grupos funcionales presentes.

La mayoría de los monómeros y polímeros pueden identificarse mediante espectroscopía infrarroja (IR) en la que la energía en intervalo de longitudes de onda de 1 a 50 μm , está asociado con el espectro de rotación y vibración-rotación de las moléculas del polímero, movimientos que se comparan con los movimientos de moléculas pequeñas de estructura conocida. Las aplicaciones de la espectrometría en el infrarrojo se dividen en tres grandes categorías relacionadas con tres regiones espectrales. La región más ampliamente utilizada es la del infrarrojo medio, que se extiende desde casi 670 hasta 4000 cm^{-1} (2,5 y 14,9 μm). La espectrometría de absorción y reflexión en el infrarrojo medio es una de las principal herramientas para determinar la estructura de especies orgánicas y bioquímicas. La frecuencia aproximada (o número de onda) a la que un grupo funcional, como C=O, C=C, C-H, u O=H, absorbe radiación en el infrarrojo se puede calcular a partir de las masas de los átomos y de la constante de fuerza del enlace entre ellos. Estas frecuencias, denominadas *frecuencias de grupo*, rara vez permanecen invariables, debido a las interacciones con otras vibraciones asociadas a uno o a los dos átomos que forman el grupo. Por otra parte, los efectos de dichas interacciones suelen ser pequeños; como consecuencia de ello, se puede asignar un intervalo de frecuencias dentro del cual es muy probable encontrar el máximo de absorción para un grupo funcional determinado. De esta forma se pueden inferir los grupos funcionales que componen a la muestra analizada.

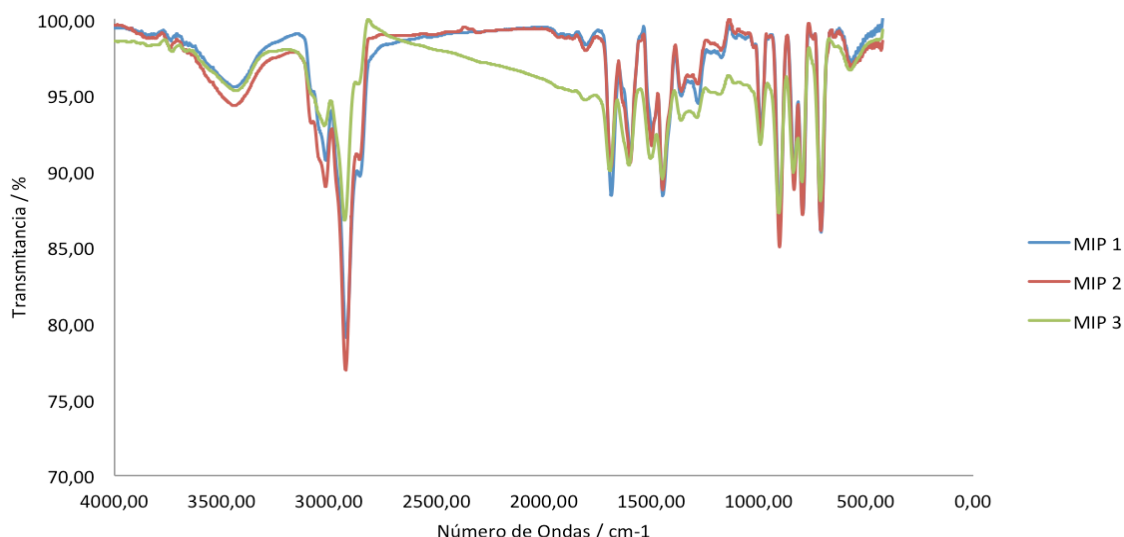


Figura N°16. Espectro FT-IR para los MIPs 1,2 y 3, medidos en KBr a 25°C.

En la figura 16 se puede apreciar los espectros FT-IR correspondientes a los MIPs 1, 2 y 3. El monómero base utilizado en la síntesis es vinil-2-pirrolidona, cuyas bandas características se encuentran en los MIPs sintetizados correspondientes a este sistema y son las siguientes:

Poli-1-vinilpirrolidona tiene una banda característica a 1682 cm^{-1} que se atribuye a un modo vibracional mixto que contienen las principales contribuciones del grupo carbonilo y vibraciones de estiramiento N-C. La banda de absorción a 2923 cm^{-1} correspondiente a la vibración asimétrica de C-H de la cadena alifática del polímero y la banda centrada a 3493 cm^{-1} corresponde a agua.

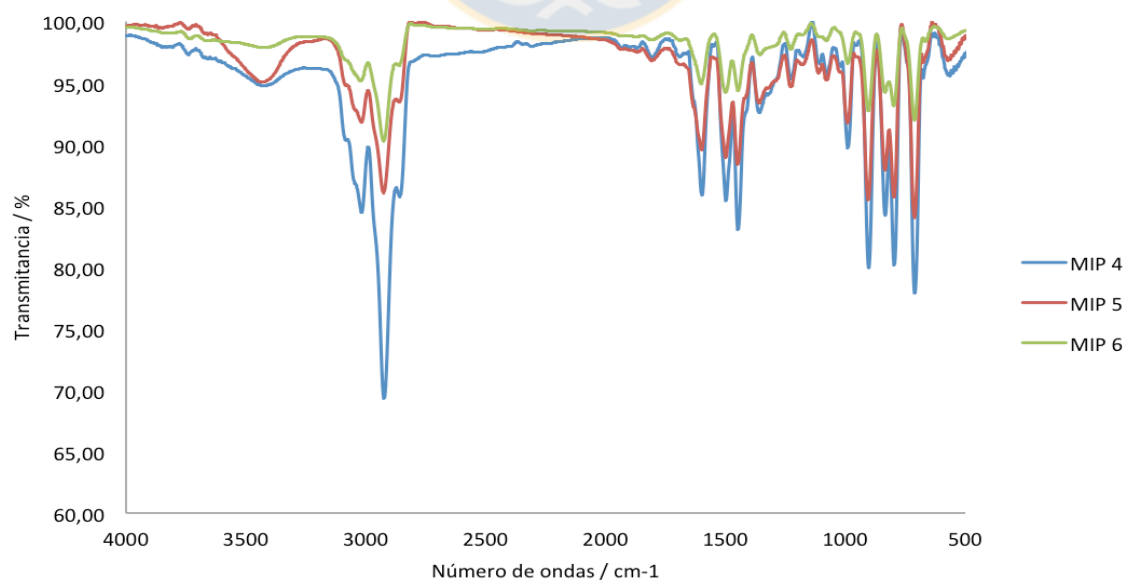


Figura N°17. Espectro FT-IR para los MIPs 4, 5 y 6 medidos en KBr, a 25°C.

En la figura 17 se puede apreciar los espectros FT-IR correspondientes a los MIPs 4, 5 y 6. El monómero base es; vinilimidazol. Al igual que en el caso anterior se busca que las bandas características de la unidad repetitiva estén presentes en los MIPs obtenidos.

A 2920 cm^{-1} se observa la banda de vibración asimétrica C-H correspondiente a la cadena alifática del polímero. En tanto a 1496 cm^{-1} se observa una banda de stretching vibracional C=N del correspondiente anillo de imidazol. La banda en 3400 cm^{-1} corresponde a agua.

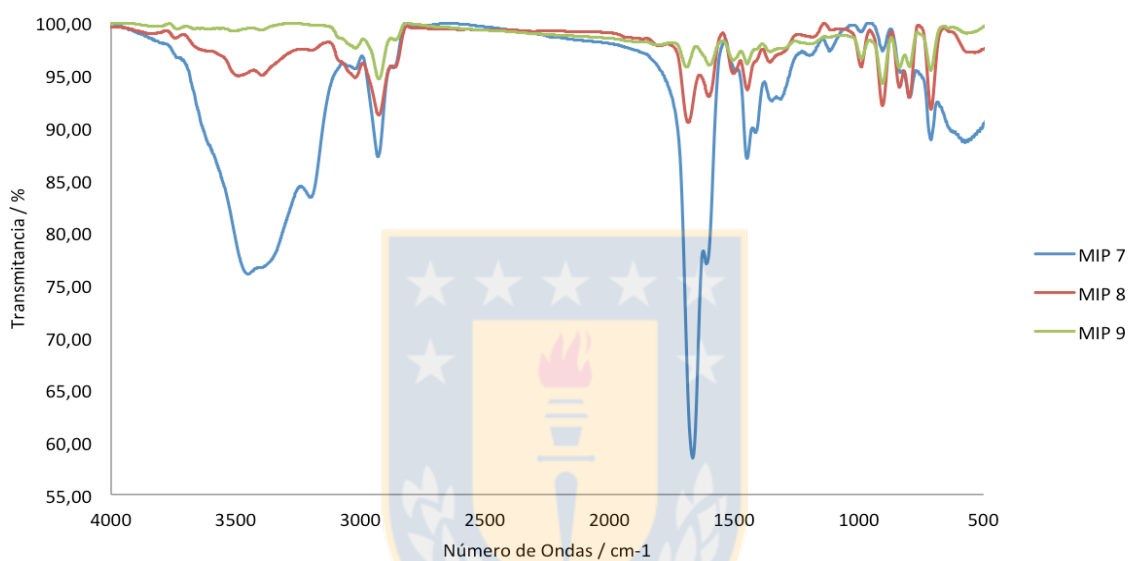


Figura N°18. Espectro FT-IR para los MIPs 7, 8 y 9, medidos en KBr a 25°C .

En la figura 18 se pueden apreciar los espectros FT-IR correspondientes a los MIPs 7, 8 y 9. El monómero base es; acrilamida, y las bandas más característicos de esta unidad repetitiva son:

La banda centrada en 3361 cm^{-1} y la banda centrada en 3491 cm^{-1} corresponden al *stretching* vibracional simétrico y asimétrico respectivamente, del grupo amino N-H, la pequeña banda centrada en 1603 cm^{-1} corresponde a la flexión del grupo N-H, y la banda centrada en 1662 cm^{-1} corresponde al *stretching* característico del grupo C=O. Todas las bandas mencionadas corresponden al grupo R-CONH₂ perteneciente a la acrilamida. Además hay una banda centrada en 1416 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del grupo N-H.

El MIP 7 presenta una banda muy amplia y ancha centrada en 3400 cm^{-1} . El tamaño de esta banda, que sale fuera de la norma, es debido a la absorción de agua.

3.4.2 Caracterización de MIPs mediante microscopia electrónica de barrido -SEM-.

La técnica SEM permite el estudio de las características superficiales de una muestra, utilizando como sonda un haz de electrones, a diferencia de la microscopía óptica que utiliza luz. En el microscopio electrónico de barrido, un haz de electrones es la sonda del microscopio. Éste es generado por un filamento caliente, y en su viaje a través del vacío tiende a separarse debido a las fuerzas de repulsión electrostática que actúan entre ellos. Un campo eléctrico generado por placas se encarga de focalizar el haz y condensarlo y por último, en su camino hacia la muestra, el haz es deflectado hacia un punto mediante bobinas electromagnéticas, de manera que éstas permiten realizar un barrido a la zona que se quiere estudiar, mientras un detector cuenta el número de electrones secundarios de baja energía emitidos por cada punto de la superficie. Al mismo tiempo se utiliza el foco de un tubo de rayos catódicos para proporcionar contraste a la imagen.

La interacción de los electrones incidentes con la muestra produce una serie de radiaciones secundarias: electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones transmitidos, radiación x, electrones Auger, catodoluminescencia y energía absorbida (por la muestra). La utilización de una u otra permite obtener distintas informaciones sobre la muestra. En esta caracterización nos basaremos en los electrones secundarios.

Los electrones secundarios son los que han recibido una transferencia de energía mediante algún proceso de dispersión inelástica a una distancia pequeña de la superficie. Ésta es la señal que proporciona una imagen real de la superficie que se estudia. Se considera un electrón secundario aquél que emerge de la superficie de la muestra con una energía inferior a 50 eV.

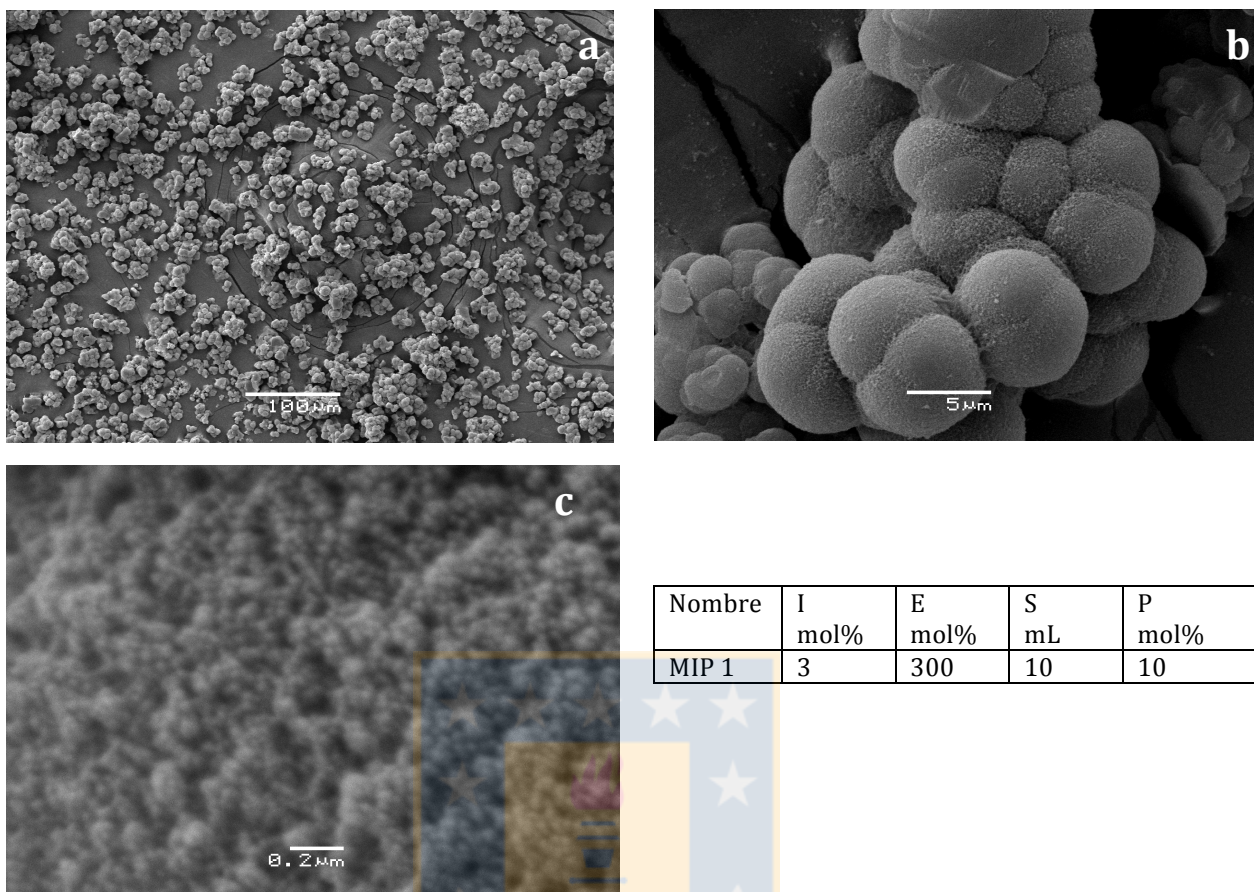


Figura N°19. Micrografías de barrido electrónico del MIP 1, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)3500x y c)55000x.

En estas micrografías se puede apreciar la forma, y la morfología del MIP analizado. Lo ideal en la síntesis de MIPs es obtener esferas, ya que éstos son unos de los cuerpos geométricos que presentan una mayor área superficial, que es lo que finalmente se busca obtener en este tipo de materiales.

En la figura 19a) se puede apreciar cómo se distribuye el material en la grilla del análisis; se observa la forma esférica que tienen los polímeros.

En la figura 19b) se puede observar mucho más de cerca el material, y se puede apreciar con mayor definición la forma y la superficie de los MIPs: se pueden observar microesferas con diámetros cercanos a los 2 o 2,5 μm . Este diámetro está totalmente condicionado a la zona en la que se haga el análisis y al tratamiento previo del material. En cuanto a la superficie se puede ver que hay rugosidad en ésta, lo que se puede percibir como poros.

En la figura 19c) queda en evidencia la presencia de poros en la superficie del MIP. Lo más interesante es que se observa que las microesferas, en realidad están compuestas de esferas mucho más pequeñas, que es lo que se busca al momento de obtener un material que presente características propias de un material adsorbente.

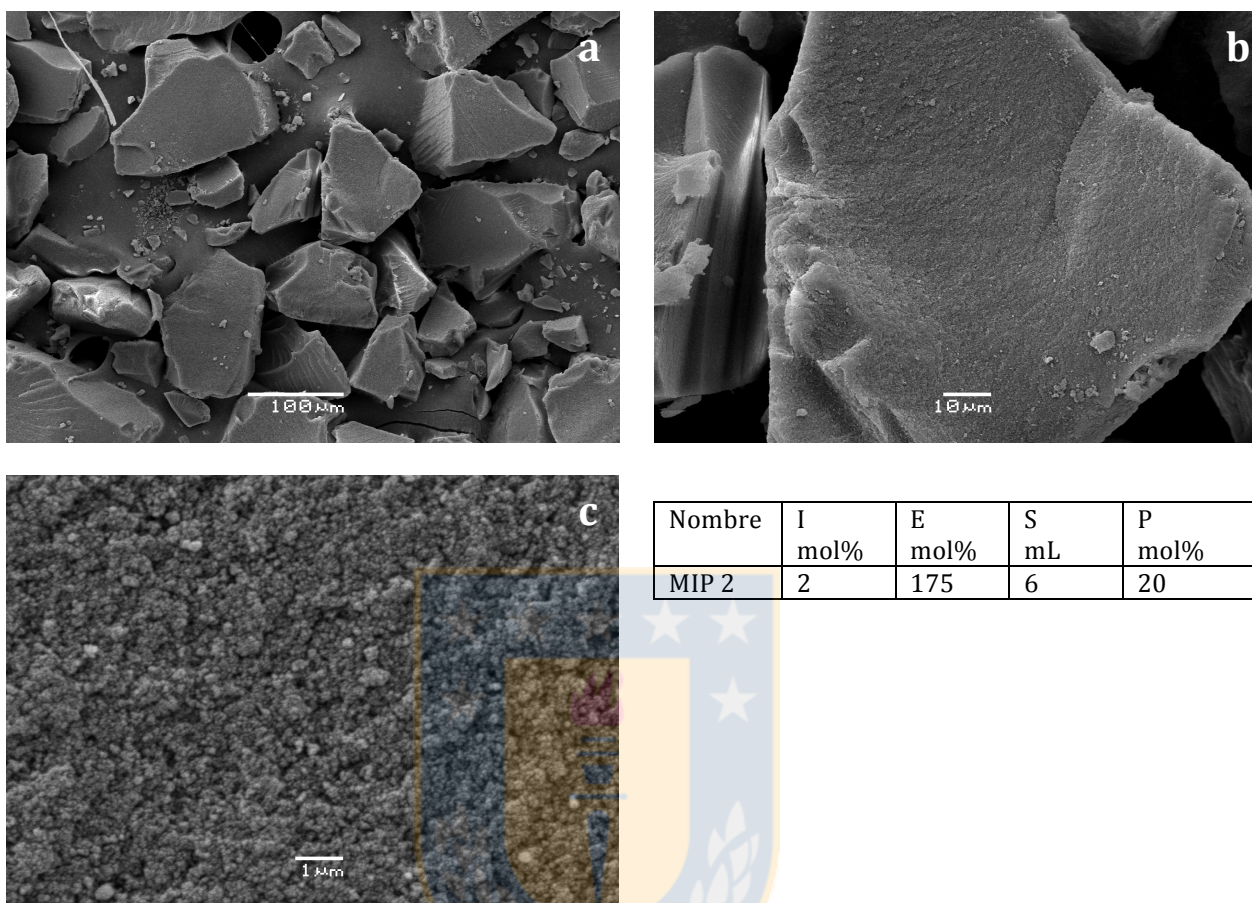


Figura N°20. Micrografías de barrido electrónico del MIP 2, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)10000x.

La primera apreciación que se puede hacer sobre la morfología de los materiales obtenidos es que es distinta si la comparamos con el caso anterior. Se observan partículas mucho menos definidas, que además están distribuidas de una forma más heterogénea en la grilla del análisis.

En la figura 20a) se pueden ver micropartículas rígidas y duras, con ángulos rectos, probablemente esta forma se debe al tratamiento previo de molienda y tamizado. Otra causa puede ser la composición de la síntesis, es decir, la cantidad de cada reactivo que utilizó al momento de sintetizar el MIP. Este MIP es sintetizado con los puntos intermedios del diseño experimental de la síntesis.

Las variables entrecruzador y solvente son primordiales para evaluar la morfología de los polímeros obtenidos, ya que el solvente proporciona una mayor o menor homogeneidad, por ende una cantidad de solvente menor contribuye a la formación de MIPs altamente reticulados, lo que se explica por el efecto gel. Por otra parte, el entrecruzador indicará qué tan entrecruzado y rígido será el material que se

obtendrá. En este caso hay 175 mol% en relación al monómero de entrecruzador, es decir hay más DVB que monómero, lo que se condice con un polímero altamente entrecruzado que se obtiene en forma de cluster.

Finalmente en la figura 20c) se puede observar una zona muy definida en la que se ve como nanopartículas componen este cluster de MIP. A su vez se pueden observar canales y cavidades en la superficie, lo que puede ser un indicativo de la potencialidad de este material para ser utilizado como extractor en fase solida.

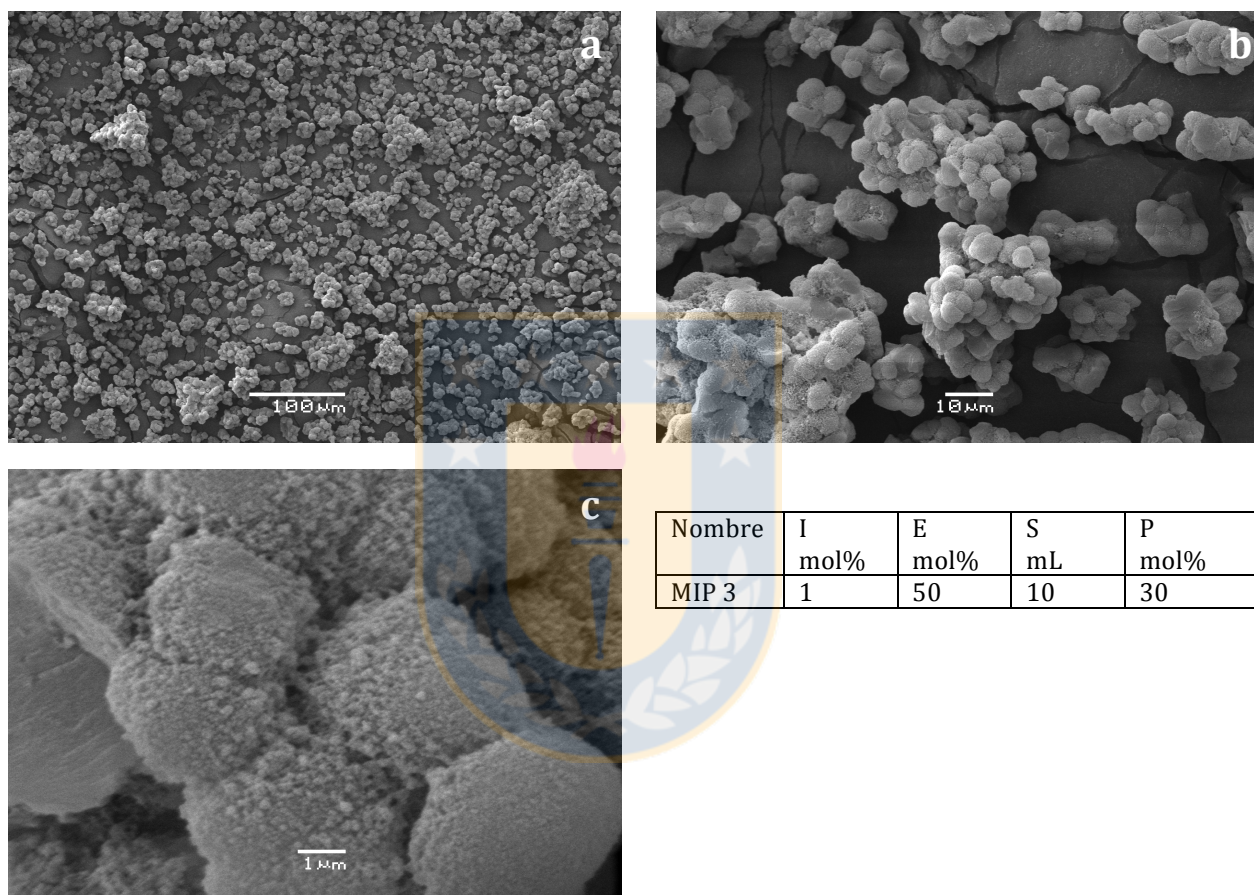


Figura N°21. Micrografías de barrido electrónico del MIP 3, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)10000x.

En la figura 21a) se observa la morfología que presenta el MIP 3, distinguiéndose en primer lugar partículas esféricas distribuidas homogéneamente en la grilla del SEM.

En la figura 21b) se puede apreciar la morfología de la superficie de los MIPs. Se observa que las partículas esféricas están aglomeradas y forman una especie de “racimo” de MIPs esféricos. También se observa que las microesferas tienen una distribución de tamaños relativamente homogénea centrada en 4μm donde se pueden apreciar partículas más grandes y más pequeñas. En este MIP se corrobora la hipótesis previamente planteada, en cuanto a que el entrecruzador y el solvente juegan un papel crucial en la morfología del material obtenido, en este caso los MIPs 3

tienen la mínima cantidad de entrecruzador, es decir, 50 mol% del monómero, lo que indica que el componente mayoritario es el monómero (VPi) por lo que el material obtenido no debiese estar tan reticulado ni altamente entrecruzado, lo que puede significar la obtención de materiales esféricos. Por otra parte al evaluar el solvente que en este caso es máximo (10 mL de solvente), lo que se refleja en un material menos empaquetado, es decir, más homogéneo.

Por último en la figura 21c) se ve una micrografía de una zona puntual, se observa la rugosidad de la superficie, siendo éste un resultado interesante, ya que los materiales seleccionados deben contar con un alta área superficial y la aparición de estos poros se condice con lo buscado. La morfología que se aprecia da indicios de que este material podría ser un buen extractor en fase sólida.



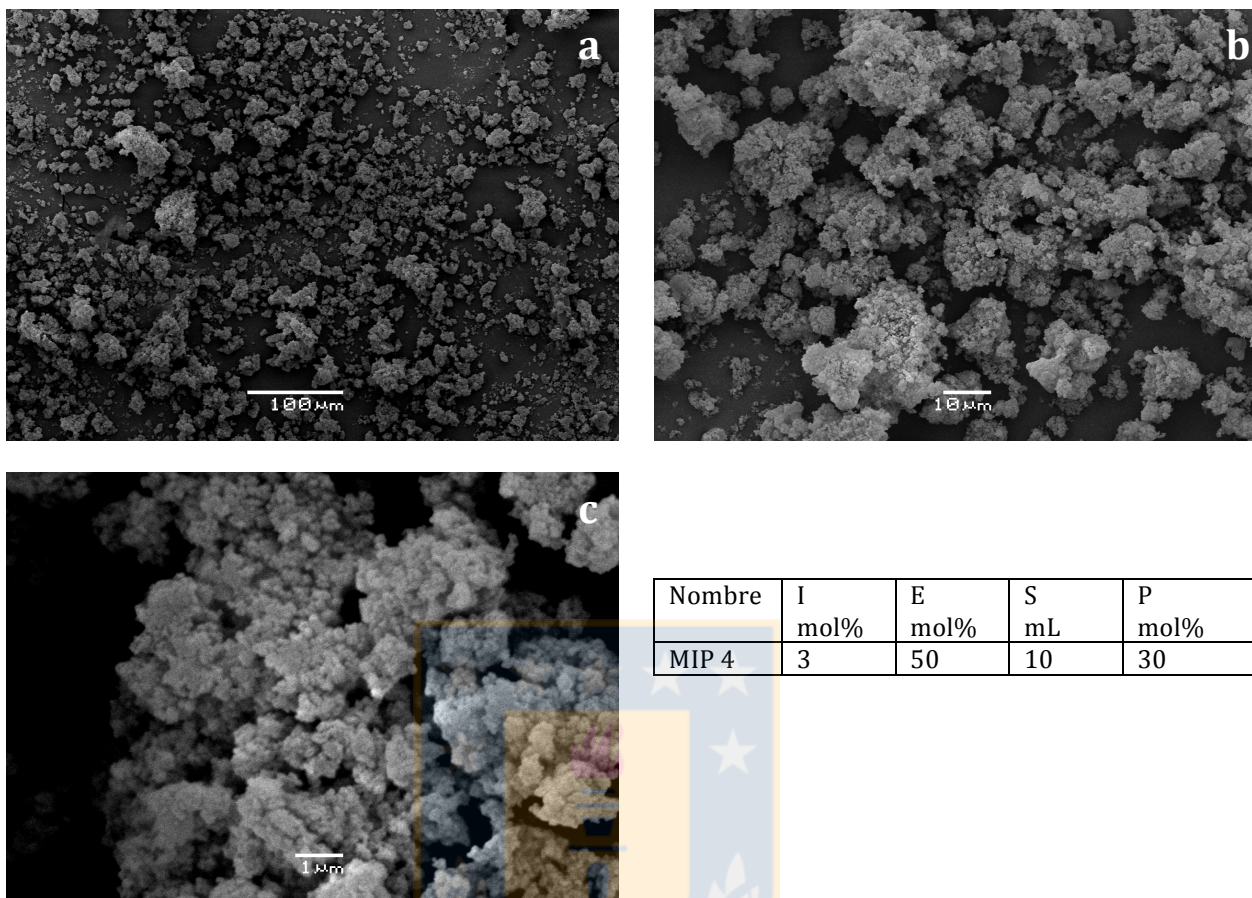


Figura N°22. Micrografías de barrido electrónico del MIP 4, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)10000x.

Lo primero que surge al ver las micrografías del MIP 4, presentes todas en la figura 22, es el tamaño de las partículas, que son evidentemente más pequeñas que en los MIPs evaluados previamente. Esto se puede deber al cambio de monómero (VPi) para los tres casos anteriores y ahora es el (VIm).

En las tres micrografías se observa la misma tendencia: micropartículas esféricas muy aglomeradas, con diámetros más pequeños que en los otros sistemas evaluados con antelación. Por otra parte se repite un parámetro en común la cantidad de entrecruzador es la mínima (50 mol% en relación al monómero) y la cantidad de solvente es máxima (10 mL), lo que nuevamente da ideas para entender la morfología del material obtenido, donde se ven partículas muy pequeñas aglomeradas, pero no fuertemente empaquetadas, lo que pudiese implicar una elevada área superficial.

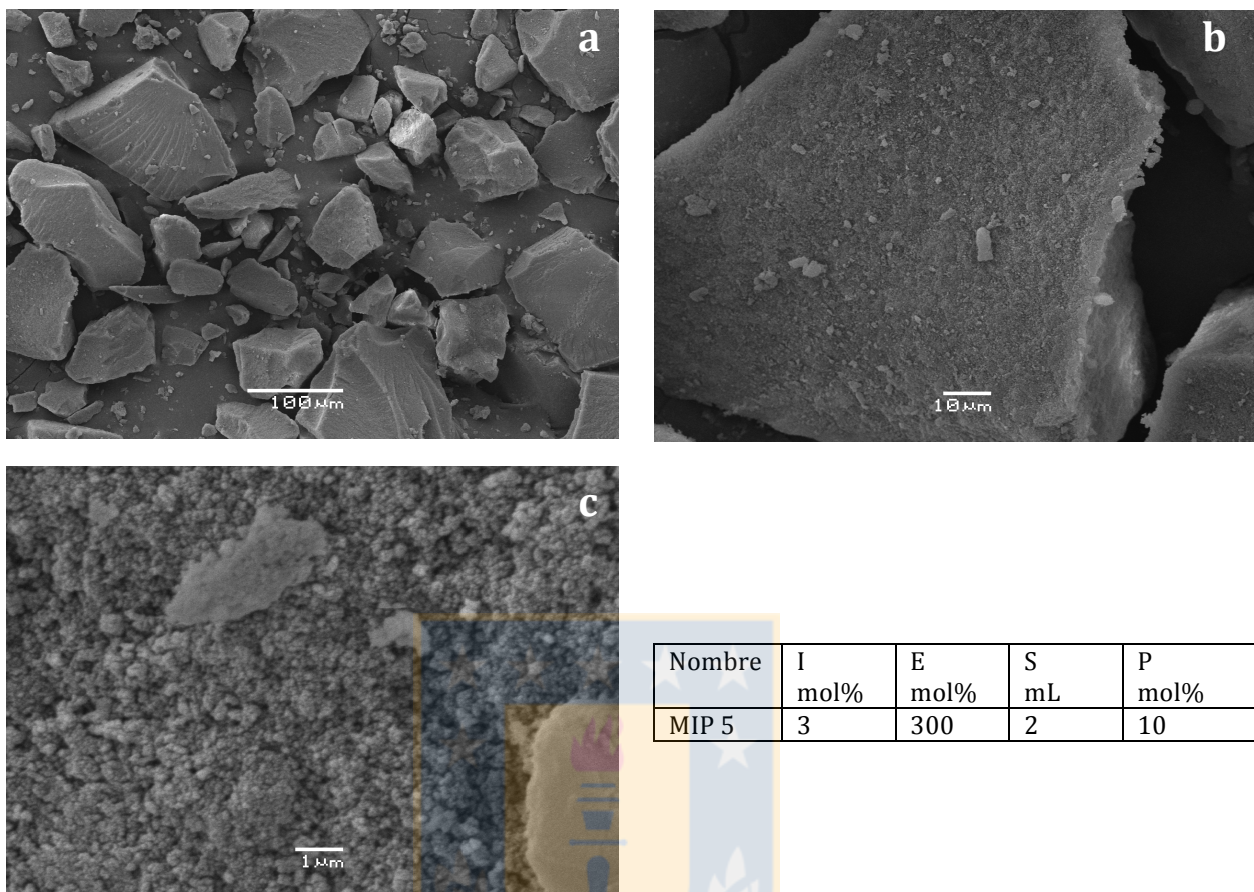


Figura N°23. Micrografías de barrido electrónico del MIP 5, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)10000x.

En la figura 23a), que contiene al MIP 5, se aprecia es que nuevamente hay una distribución heterogénea de las partículas, se observa un material rígido y empaquetado, al evaluar las condiciones de la síntesis se observa que la cantidad de solvente utilizado es la mínima es decir 2 mL, por lo que el efecto gel del MIP 5 es elevado. Es decir, la mezcla de polimerización no está lo suficientemente homogeneizada debido al volumen en la reacción. Otro fenómeno que se atribuye al efecto gel puede ser el rápido fin de la propagación de la síntesis y su subsecuente término, lo que se puede reflejar en materiales duros y heterogéneos. Si a esto se le suma el hecho de que la cantidad de entrecruzador en el MIP 5 es la más elevada (300 mol% en relación al monómero) es comprensible la obtención de un material rígido, altamente empaquetado, heterogéneo y con un tamaño relativamente grande comparado con los MIPs estudiados previamente.

Al observar las figuras 23 b y c) es interesante ver que si bien el material es altamente reticulado, éste se compone principalmente de nanopartículas que tienen formas esféricas, donde se puede apreciar que hay canales y cavidades entre ellas, lo que puede dar un indicio de que si bien es un MIP más duro que los evaluados

anteriormente, no necesariamente debiese tener un área superficial menor, o no necesariamente debiese presentar retenciones de DFA menores

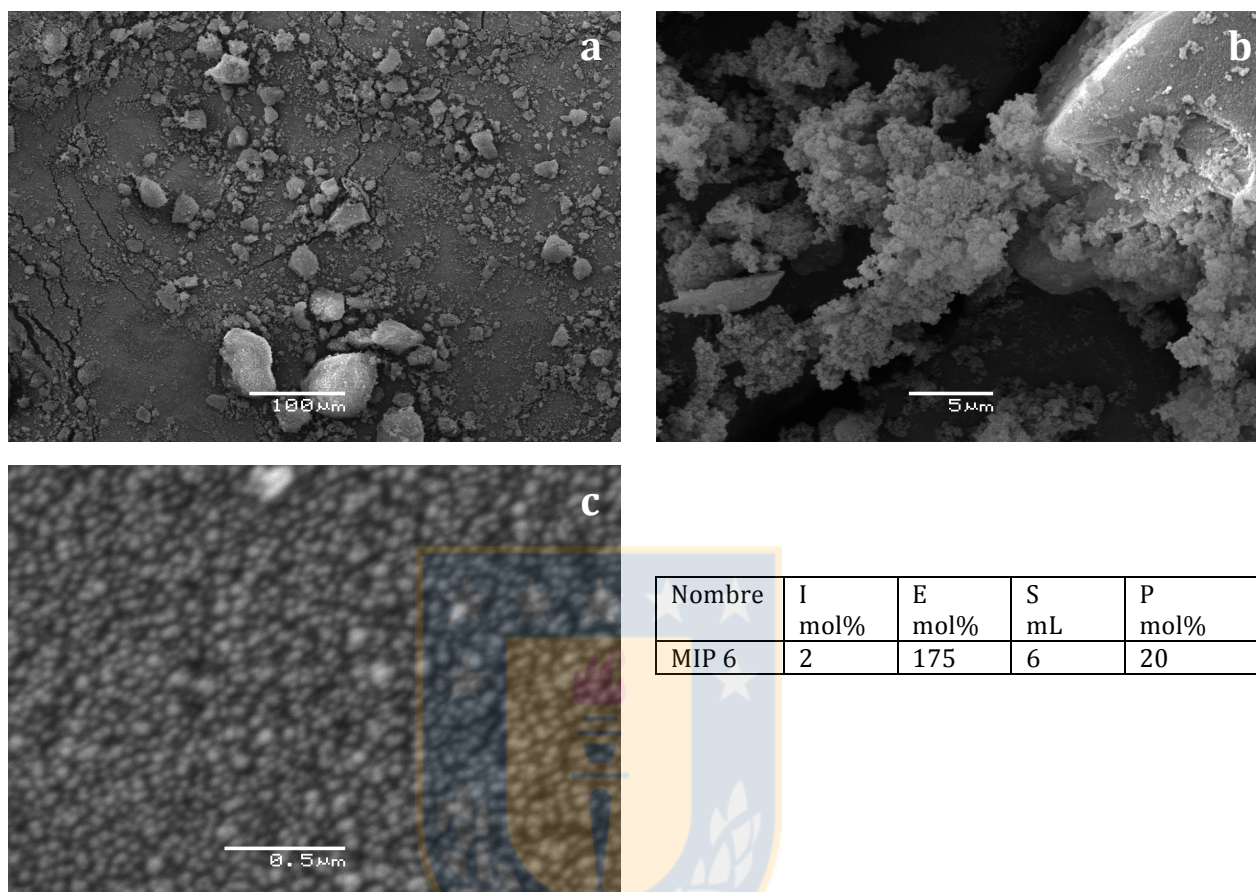


Figura N°24. Micrografías de barrido electrónico del MIP 6, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)3500x y c)50000x.

En la figura 24a) que contiene al MIP 6, lo primero que se aprecia, es que se hay una distribución heterogénea de los tamaños de partículas se observan partículas grandes y semirrígidas y otras más pequeñas y esféricas. En general el tamaño de estas partículas es relativamente menor a las obtenidas en los MIPs 4 y 5, donde se utiliza el mismo monómero VIm.

En la figura 24b) se observa una micrografía en que se ven los dos tipos de partículas que se mencionan en el párrafo anterior. Se observa una partícula grande y reticulada y por otra parte se pueden apreciar partículas notablemente más pequeñas en forma de racimos de esferas. Al evaluar el MIP 6 en términos de sus componentes sintéticos y sus cantidades de la mezcla de reacción están en las cantidades denominadas intermedias, es decir un 2 mol% de iniciador, un 175 mol% de entrecruzador, un 20 mol% de plantilla y 6 mL de solvente.

En la figura 24c) se puede ver una micrografía muy puntal en la que se pueden observar que nanopartículas con forma esférica componen el MIP. Las zonas oscuras se pueden interpretar como canales o cavidades disponibles, lo que es esperado, ya que la existencia de cavidades supone un área superficial considerable, lo que se condice con un material que presenta capacidades de adsorber analitos.

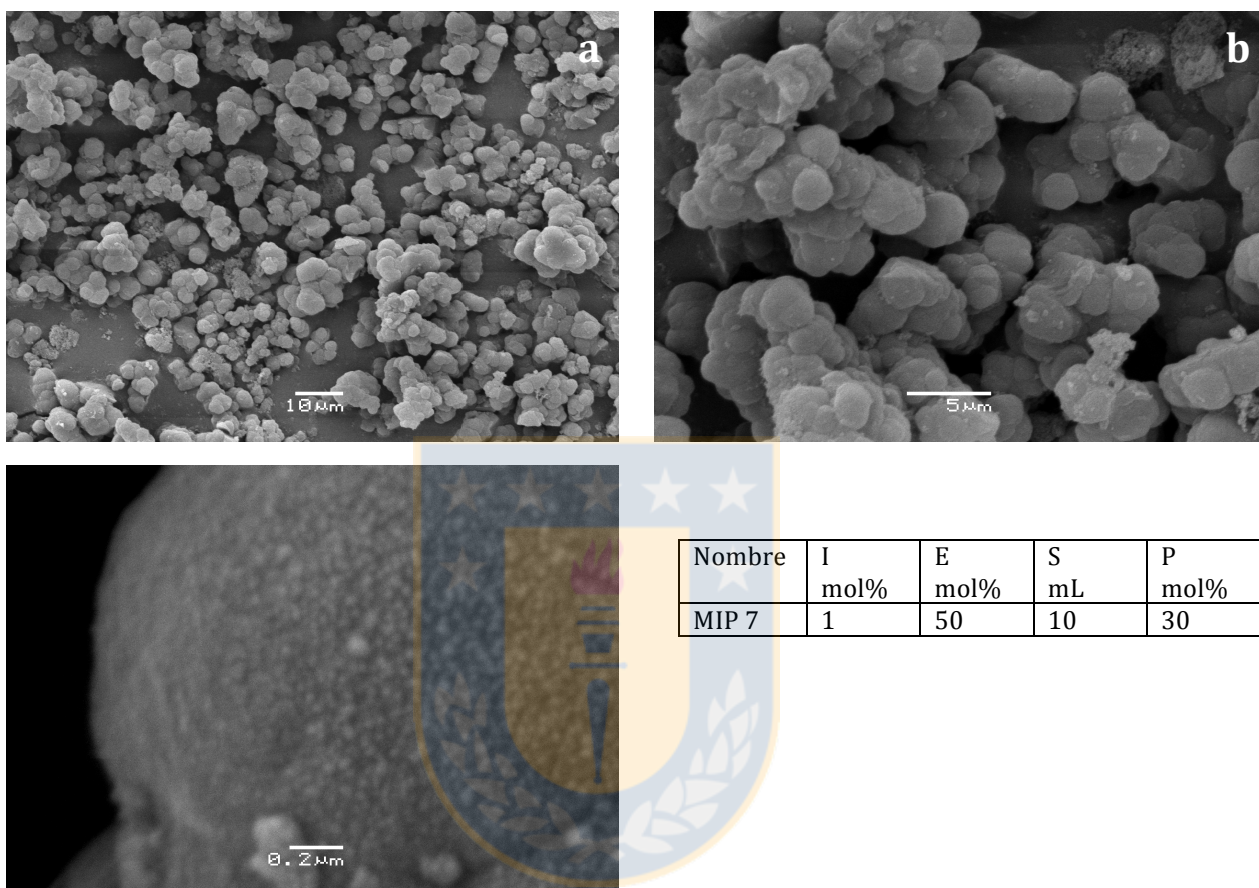


Figura N°25. Micrografías de barrido electrónico del MIP 7, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)3500x y c)55000x.

En la figura 25a) se observa que el material obtenido nuevamente presenta forma de esferas distribuidas homogéneamente en la grilla de la micrografía. Cabe destacar que los MIPs 7, 8 y 9 están constituidos por un monómero diferente que los estudiados previamente, ahora es Acrilamida (AAm). Las cantidades de entrecruzador y solvente utilizados en esta síntesis son 50 mol% de monómero para el entrecruzador y 10 mL para el solvente, por lo que no es raro que los materiales obtenidos tengan forma esférica, lo que se condice con las explicaciones anteriores. Un MIP que pudiese dar una buena comparación de la morfología de éstos puede ser el MIP3, que si bien tienen un monómero distinto (VPi) las cantidades de la mezcla de reacción fueron las mismas, es decir 1 mol% de iniciador 50 mol% de entrecruzador, 10 mL de solvente y 30 mol% de entrecruzador. Estos dos MIPs presentan una morfología similar, al igual que la distribución de tamaños de ambos, lo que da indicios de que la cantidad de los

reactivos utilizados en la mezcla de polimerización tiene importantes efectos en la morfología del material que se obtendrá.

Al observar desde más cerca en la figura 25b) se pueden ver las esferas con un mayor grado de definición, es posible apreciar que hay algunas esferas que están rotas, esto es debido a el proceso de molienda que es necesario para obtener un material particulado fino, por otra parte nuevamente es posible ver que hay microesferas más pequeñas que otras y el diámetro está distribuido alrededor de 2 o 3 μm .

En la figura 25c) se puede observar una micrografía mucho más enfocada, viendo solo una microesfera, y se obtiene un resultado singular que no se había observado anteriormente, las microesferas al parecer en su totalidad están compuestas por nanopartículas esféricas y cavidades entre ellas.

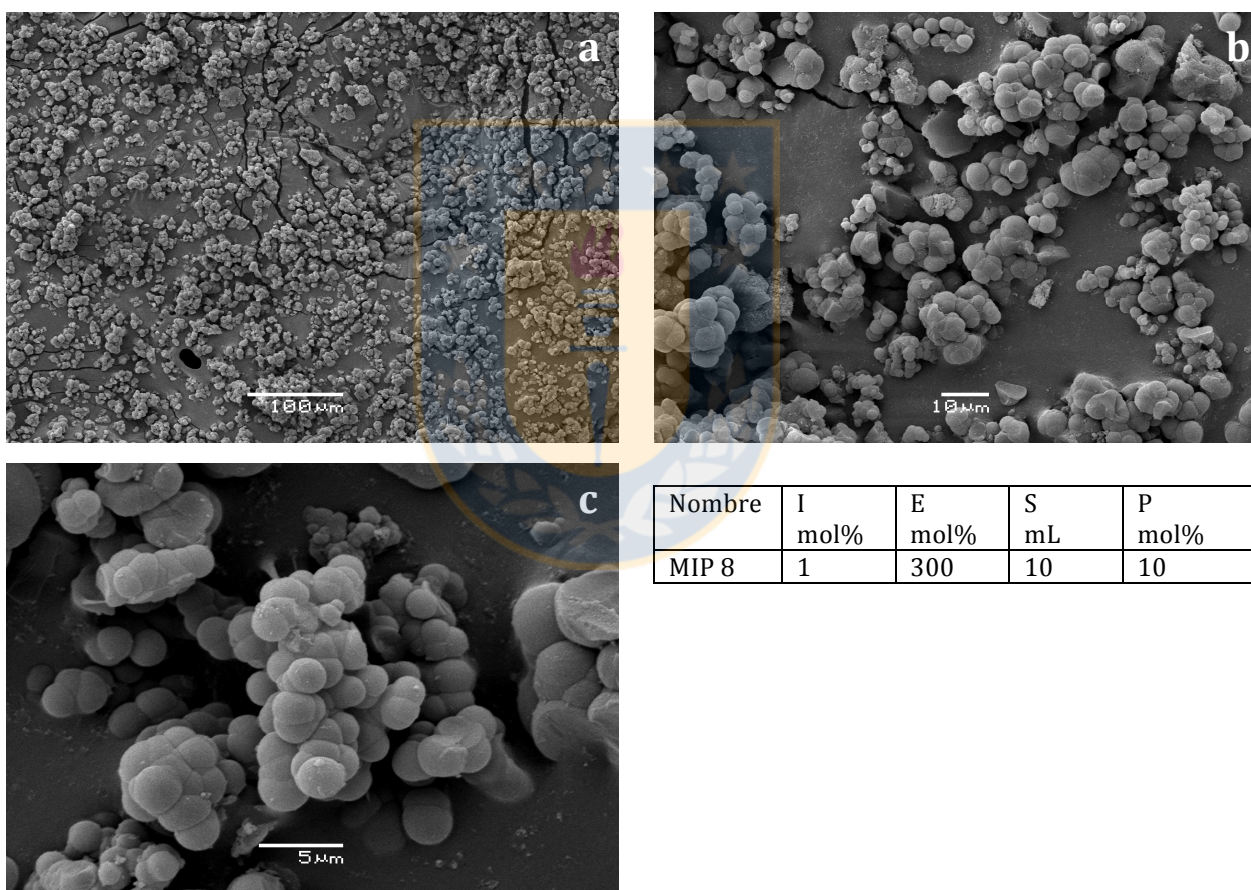


Figura N°26. Micrografías de barrido electrónico del MIP 8, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)1000x y c)3500x.

En la figura 26a) se puede observar una distribución homogénea de microesferas. La cantidad de entrecruzador en este caso incrementa y hay 300 mol% de entrecruzador, por lo que se espera que el material esté más altamente entrecruzado, pero a su vez la cantidad de solvente también es alta, por ende, la mezcla de síntesis se homogeneizó

correctamente. Debido a este hecho es que los materiales se obtienen en forma esférica y no como aglomeraciones rígidas de MIPs.

En la figura 26b) se puede apreciar que las microesferas están bien definidas y otro hecho que se repite es que hay una distribución de los tamaños de las partículas centrada en 2,5 o 3 μm .

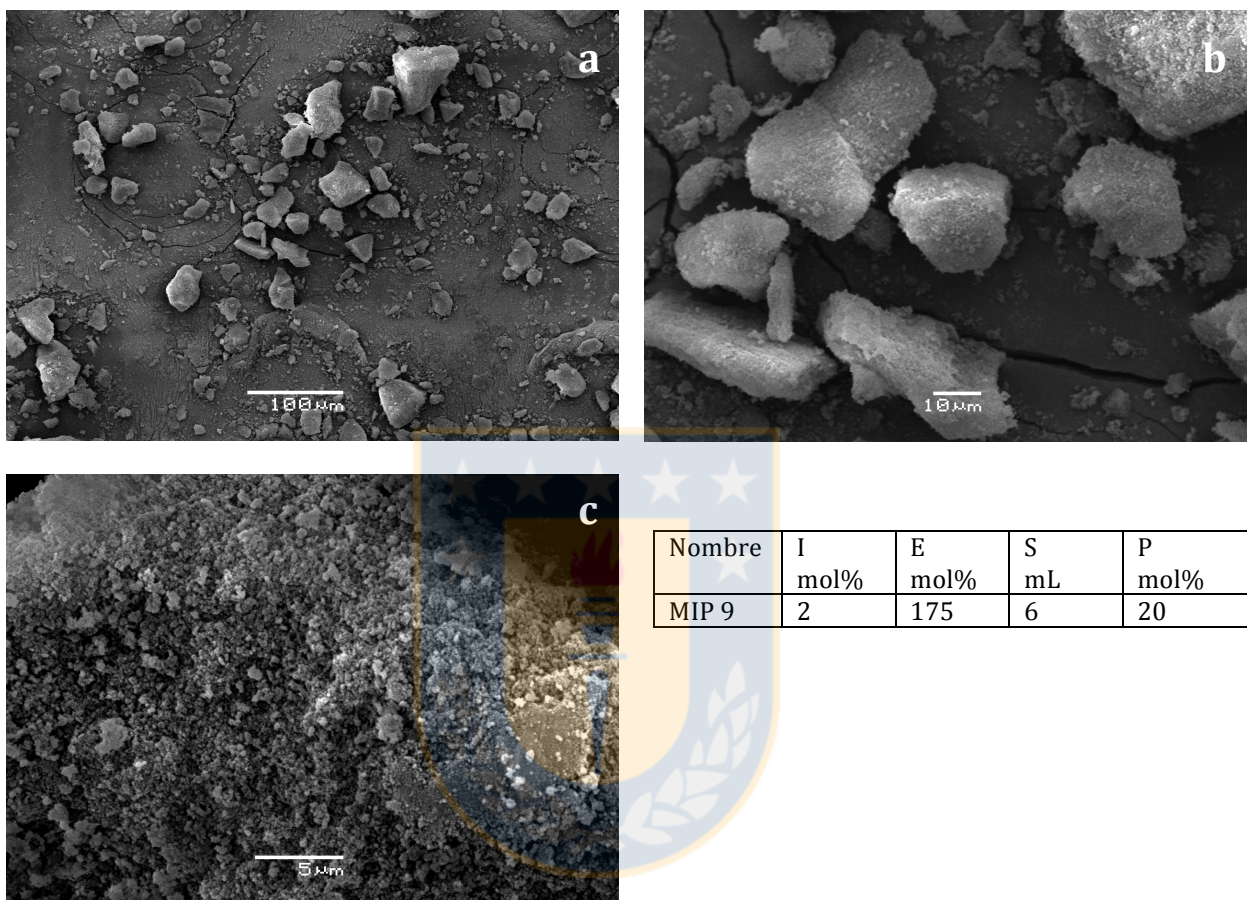


Figura N°27. Micrografías de barrido electrónico del MIP 9, con distintos niveles de acercamiento, a)200x, b)3500x y c)55000x.

La primera observación que se puede hacer al observar la figura 27 es que hay una morfología distinta que la obtenida en los MIPs 7 y 8. Este sistema de síntesis se llevó a cabo utilizando las cantidades medias de los reactivos y el solvente, es decir 2 mol% de iniciador, 175 mol% de entrecruzador 6 mL y 20 mol% de plantilla. Es interesante comparar el MIP 9 con el MIP 6, aunque los monómeros son diferentes AAm y VPi respectivamente, el tamaño y la morfología de estos dos MIPs es muy similar. Lo interesante es que ambos MIPs siguen la misma proporción de reactivos y solvente durante la síntesis. Esto puede indicar que la naturaleza del solvente no es la variable más importante a la hora de obtener cierta morfología en los materiales.

En la figura 27a) se ve una distribución bastante aleatoria en la que se pierden nuevamente la forma de las esferas que se han visto en otros casos, dando paso a muestras sin una forma definida.

En la figura 27c) se puede observar una fracción del MIP en que se ve que los MIPs están compuestos de partículas muy pequeñas y por otra parte se puede apreciar que hay cavidades en esta zona que pueden explicar la capacidad de estos MIPs de adsorber analitos.

En general en la síntesis de MIPs y NIPs se intenta controlar la obtención de partículas de tamaño y forma definida.

Para esto se debe controlar el método de polimerización ya que éste influye en la morfología interna y externa del polímero. En general en una polimerización en solución las partículas presentan irregularidades de tamaño y forma debido al proceso de molienda y tamizado, debido a esto algunos sitios de interacción pueden ser destruidos.

A pesar de la dificultad de obtención de partículas esféricas mediante la polimerización en solución se ha informado que la utilización de exceso de solvente porógeno contribuye a la formación de este tipo de partículas debido a que las cadenas poliméricas en formación no son capaces de ocupar el volumen total de disolvente, produciendo una dispersión de partículas esféricas independientes en la disolución. También ha sido informado que un proceso de polimerización más lento podría dar lugar a la formación de partículas esféricas ya que da más tiempo para la formación de este tipo de partículas¹⁰⁶. Otro factor que puede influir en este hecho es la utilización de un monómero hidrofóbico y un solvente hidrofílico, lo que podría provocar una repulsión en la disolución que provocaría una polimerización del tipo interfacial, en donde, por esta repulsión, se generarían las partículas esféricas.

3.4.3. Caracterización de MIPs mediante análisis termogravimétrico (TGA).

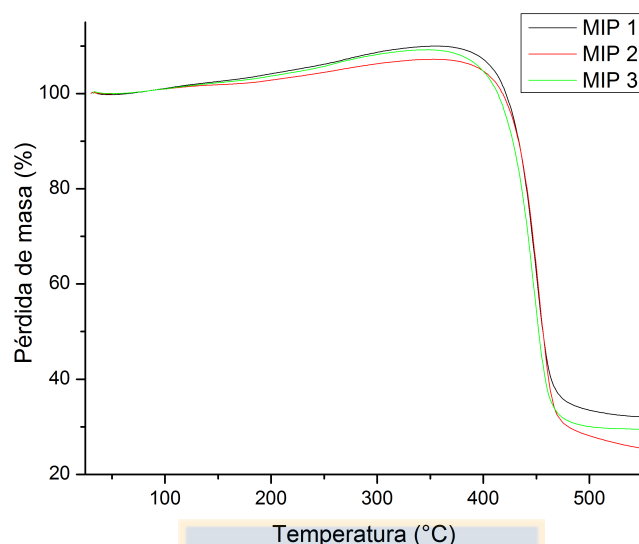


Figura N°28. Análisis termogravimétrico para MIPs 1,2 y 3.

En la figura 28 se pueden observar los termogramas obtenidos para los MIPs de sistema 1. Para realizar este análisis se registró continuamente la masa de la muestra en función de la temperatura. El resultado es el esperado, como se puede observar los tres MIPs tienen una temperatura de descomposición sobre los 370°C, lo que indica el alto grado de reticulación y entrecruzamiento característico de los MIPs. Como se puede ver no existe una diferencia evidente en cuanto a la temperatura de descomposición de los 3 MIPs. Se puede mencionar que la temperatura de descomposición es ligeramente mayor para el MIP 1, que coincidentemente tiene el mayor porcentaje de de entrecruzador de los 3 MIPs. Pero aun así los tres MIPs presentan temperaturas de descomposición similares, lo que indicaría que no se observan diferencias significativas en la estabilidad térmica de los MIPs al utilizar 50 mol % o 300 mol % de entrecruzador. Por último se puede observar que sobre 550°C la descomposición permanece estable, es decir la masa residual no varía.

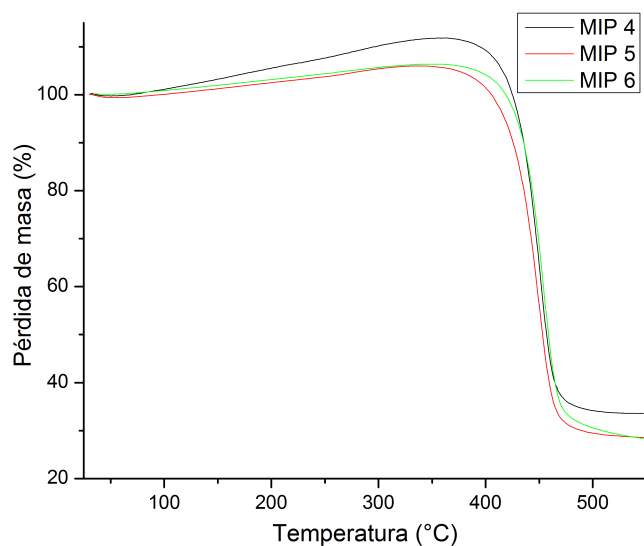


Figura N°29. Análisis termogravimétrico de los MIPs 4, 5 y 6.

El análisis de los termogramas de los MIPs correspondientes al sistema 2 (Ver figura 29) es muy similar a los evaluados en el sistema 1. Se puede observar la alta temperatura de descomposición que los materiales presentan, sobre los 350°C. Por otra parte en una primera etapa se puede observar que los MIPs presentan solo una pérdida de masa, lo que significa que los MIPs no se descomponen en fracciones y presentan una elevada estabilidad térmica. Otro punto importante a destacar es que la masa residual es igual para los tres MIPs del sistema 2, lo que indicaría la homogeneidad que estos presentan en su composición, y en su estabilidad térmica.

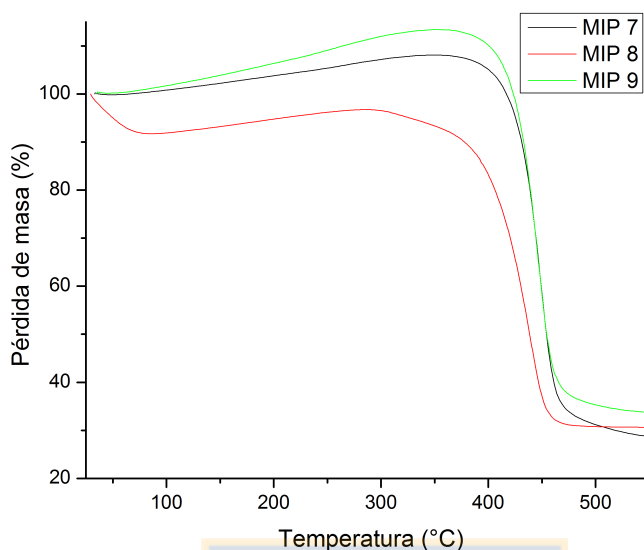


Figura N°30. Análisis termogravimétrico para los MIPs 7, 8 y 9.

En la Fig 30 se pueden observar los termogramas obtenidos para los MIPs del sistema 3 (7, 8 y 9), el resultado es concordante con el esperado, donde se obtienen resinas altamente entrecruzadas que presentan una elevada estabilidad térmica, lo que es característico para los MIPs. Como se puede apreciar en la Fig. 30 tanto MIP 7 como 9 presentan una temperatura de descomposición muy similar que esta centrada en 400°C. Por otra parte el MIP 8 presenta una pérdida de agua cercana a 100°C para luego mostrar la descomposición térmica a 400°C aproximadamente. Con los tres termogramas de los MIPs 7, 8 y 9 se puede inferir que no se descomponen en fracciones, por otra parte se observa que los MIPs presentan una elevada estabilidad térmica, por último se observa que sobre 450°C la masa residual se mantiene constante, y no presenta variaciones significativas entre los tres MIPs.

El que los MIPs presentan una elevada temperatura de descomposición y sean estables térmicamente implica que estos materiales pueden ser utilizados en distintos campos, lo más interesante es que los MIPs presentan una conjunción de propiedades, la estabilidad química y térmica de las macromoléculas se combina con las propiedades de adsorción selectiva que presentan ciertas moléculas biológicas como las proteínas, los anticuerpos o los antígenos, lo que hace que los MIPs sean atractivos para un gran número de procesos de reconocimiento molecular.

3.5. Implementación de metodología analítica para cuantificar DFA.

Para implementar un método de análisis de DFA en una mezcla de etanol-agua, se utilizó espectrofotometría UV-VIS. La curva de calibración se obtuvo mediante la medición de la absorbancia de la luz por la muestra a 284 nm (ver figura 31). utilizando 11 estándares de DFA desde $1,2 \text{ mgL}^{-1}$ hasta 20 mgL^{-1} .

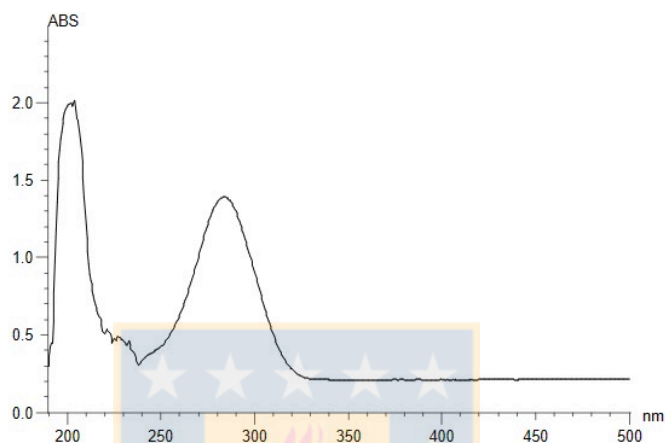


Figura N°31. Espectrograma obtenido para DFA en una solución 50:50 Etanol:Agua.

Para realizar la curva de calibración se utilizaron 11 estándares de DFA desde $1,2 \text{ mgL}^{-1}$ hasta 20 mgL^{-1} , como se puede observar en la figura 32. Para estos datos se realizó un análisis de regresión lineal, obtenido mediante el método de los mínimos cuadrados, basándose en dos suposiciones; la primera es que hay una relación lineal entre la respuesta (Absorbancia) y la concentración del analito, y la segunda es que cualquier desviación de los puntos de la línea recta surge como un error en la medición. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado para poder obtener la desviación estándar en cada punto de la curva de calibración.

La precisión del método fue determinada al evaluar la desviación estándar de las absorbancias y la varianza de las absorbancias siendo estas 0,0389 y 0,00136 respectivamente.

Para obtener el intervalo dinámico se calcularon los límites de detección y de cuantificación a partir de la medición de 30 blancos, con los cuales se obtuvo la desviación estándar de estos y posteriormente se calcularon los límites respectivos.

Para obtener el límite de detección se multiplica la desviación estándar de los blancos por 3,3 y se divide por la pendiente de la regresión lineal. Para obtener el límite de cuantificación se multiplica la desviación estándar de los blancos por 10 y se divide

por la pendiente de la regresión lineal. Así el límite de detección del método (LOD) es 0,0267 mgL⁻¹ de DFA y el límite de cuantificación del método (LOQ) es 0,0809 mgL⁻¹ de DFA.

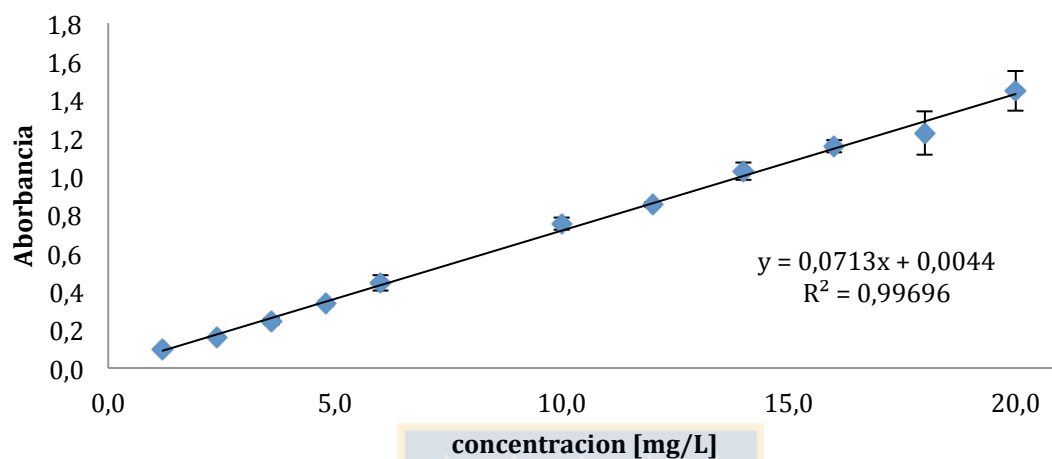


Figura N°32. Curva de calibración para DFA. Las barras de error corresponden a ± 1 la desviación estándar.

3.6. Estudio de retención de mini-MIPs.

El mecanismo fundamental para el reconocimiento molecular mostrado por el efecto de impresión puede ser atribuido a dos procesos: la pre-organización de grupos funcionales complementarios presentes en el polímero y la plantilla y la formación de cavidades selectivas que se complementan en tamaño con la plantilla. Los factores de unión y selectividad combinan sus efectos, lo que contribuye al reconocimiento molecular de los MIPs.

Para poder determinar este efecto de reconocimiento molecular se debe determinar la cantidad de difenilamina que puede retener cada polímero. En este sentido las capacidades de adsorción de los miniMIPs se evaluaron por metodología batch, se contactó una solución patrón de 100 mgL⁻¹ de DFA con 100 mg de los distintos polímeros, luego se separaron las fases y se obtuvo la concentración en el sobrenadante por espectrofotometría UV-visible. A continuación se presentan los resultados.

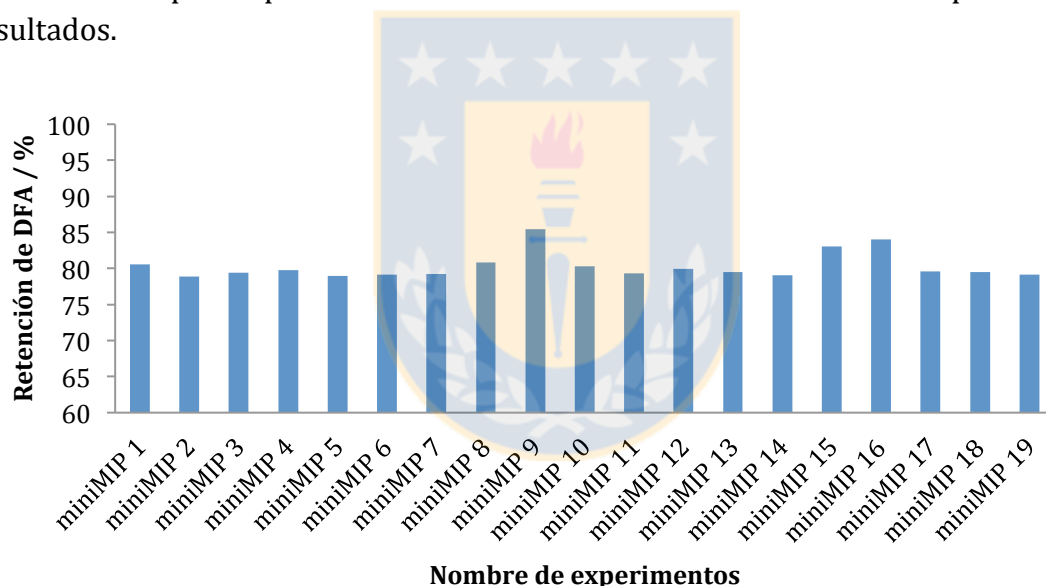


Figura N°33. Capacidades de Retención de DFA por los miniMIPs sintetizados en el sistema N°1.

En la figura 33 se puede observar la retención de los miniMIPs sintetizados en el sistema 1. Se puede apreciar que la diferencia entre el experimento con mejores resultados y peores resultados en cuanto a retención de DFA es de un 5 %, lo que muestra que la mayoría de los sistemas sintetizados podrían ser buenos extractores en fase sólida para DFA. Esta homogeneidad en la capacidad de retener o adsorber

DFA está presente en los 19 experimentos estudiados ya que los valores de retención se encuentran sobre el 80%. Este hecho es un indicativo de que las variables de la síntesis tomadas en cuenta durante el diseño experimental no son tan importantes en cuanto a la retención de DFA.

Al evaluar la reproducibilidad en la retención o adsorción de DFA por parte de los MIPs sintetizados se puede observar que las repeticiones dan resultados muy similares, el miniMIP 1 presenta un 80,6 % de retención de DFA, el miniMIP 12 presenta un 79,0 % de retención y el miniMIP 16 un 84,1 de retención de DFA. Lo que arroja un coeficiente de variación de un 3,22 %.

Se observa que el monómero utilizado (VPi) presenta buenas interacciones con la DFA, ya que se observa que el grado de retención en todos los sistemas es alto y supera el 70 % para todos los casos estudiados. En la figura 34 se puede observar un posible esquema de interacción que se da entre la DFA y el monómero VPi. Esto demuestra que la utilización de un monómero básico permite una buena retención de la molécula de DFA. Esto puede deberse a las fuertes interacciones generadas entre la plantilla y el monómero. En este sistema se genera una interacción del tipo enlace hidrógeno, que es una interacción no enlazante de carácter fuerte, lo que conllevaría a los buenos porcentajes de retención observados. Esta interacción debería ser un poco más fuerte que una que ocurra entre NH—N debido a que el oxígeno es un átomo más electronegativo que el nitrógeno.

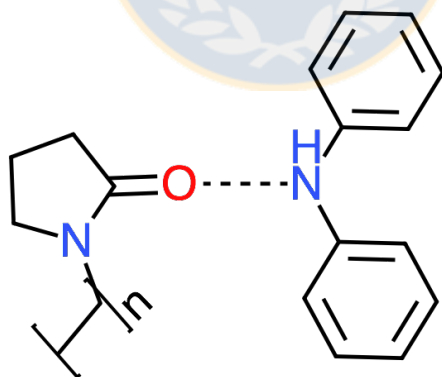


Figura N°34. Esquema de posible interacción no enlazante entre la unidad repetitiva VPi y la molécula DFA.

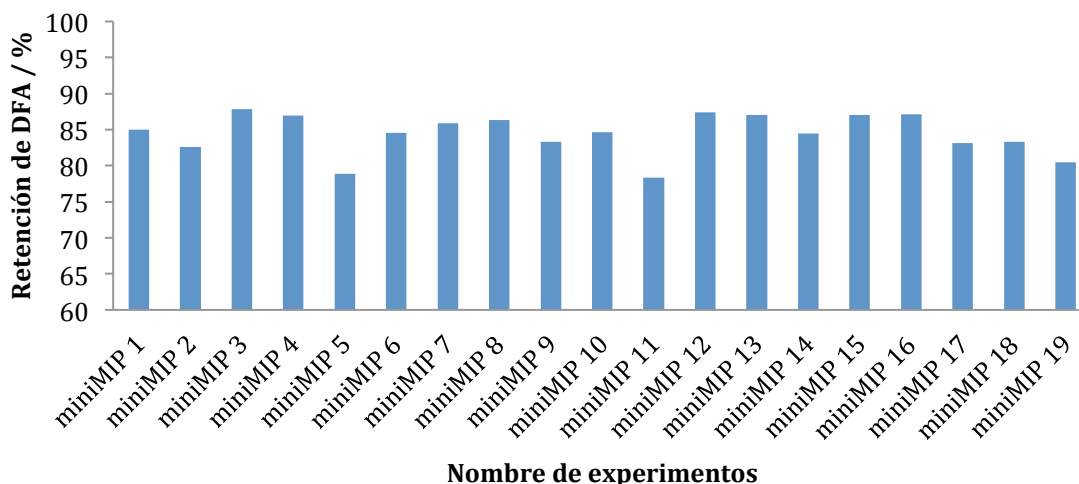


Figura N°35. Capacidades de Retención de DFA por los miniMIPs sintetizados en el sistema N°2.

Para los miniMIPs sintetizados en el sistema 2 se puede apreciar que no hay un claro experimento que destaque más que el resto en cuanto a retención de DFA (ver figura 35), ya que todos se encuentran bastante próximos en este sentido, habiendo diferencias de tan solo un 9 % entre el experimento que más retiene y el que menos. En cuanto a la variación de los experimentos se aprecia que las tres repeticiones presentan porcentajes de retención muy similares, miniMIP1 un 85,05 % el miniMIP 12 un 87,44 y finalmente el miniMIP 16 un 87,15 % de retención de DFA, obteniéndose un coeficiente de variación de 4,71 %.

En este sistema se observa que las síntesis que presentan el mínimo de retención son los experimentos denominados miniMIP 5 y miniMIP 11. Los porcentajes de retención de estos sistemas se encuentran bastante cercanos al 78 % de retención, en ambos casos hay variables en común en la mezcla de síntesis, como: el mismo porcentaje de entrecruzador (50 mol% del monómero), el mismo porcentaje de iniciador (3 mol% del monómero) y la misma cantidad de solvente (2 mL), pudiendo ser ésta la causa de su similitud en cuanto a retención de DFA. Por otra parte el hecho de que haya un mínimo de solvente puede traducirse en que hay un efecto gel elevado en estos dos miniMIPs, lo que significaría la obtención un polímero altamente empaquetado y con un elevado grado de rigidez. Por esta misma razón puede que los sitios activos a la adsorción de la DFA en el interior del polímero no tengan un acceso simple, es decir, las moléculas de adsorbato no van a llegar con facilidad al sitio de interacción, lo que podría implicar una disminución en la adsorción de DFA por parte de estos materiales.

Al evaluar los porcentajes de retención que se presentan en el sistema 2 se aprecia una homogeneidad en las retenciones para todos los experimentos. Se observa que la menor retención corresponde a un 78%, mientras que la mayor retención corresponde a un 87,9%. La diferencia entre el máximo y mínimo de retención es pequeña lo que indica que la utilización de 1-vinylimidazol como monómero es adecuada para la retención de DFA.

En este sistema se espera una buena retención por parte de los MIPs ya que debiesen existir interacciones de tipo enlace hidrógeno Fig.36a, fuerzas de dispersión de London, y pueden existir distintas interacciones π - π como: π - π *sándwich* figura 36b, π - π en forma de T figura. 36c y π - π en forma de apilamiento figura 36d. Hay que destacar que las interacciones π - π son favorecidas en medio acuoso lo que puede dar una explicación a la buena retención que en general se obtiene en este sistema. Un fenómeno que puede ocurrir y afectar en cierto sentido las propiedades de retención del material sintetizado es la posible transferencia de protones entre monómero y plantilla, lo que provocaría que durante la polimerización se podría formar cualquiera de estos dos tautómeros y en ese caso los sitios de unión podrían adoptar diferentes formas. Además la formación de estos tautómeros haría más difícil la formación del enlace hidrógeno.

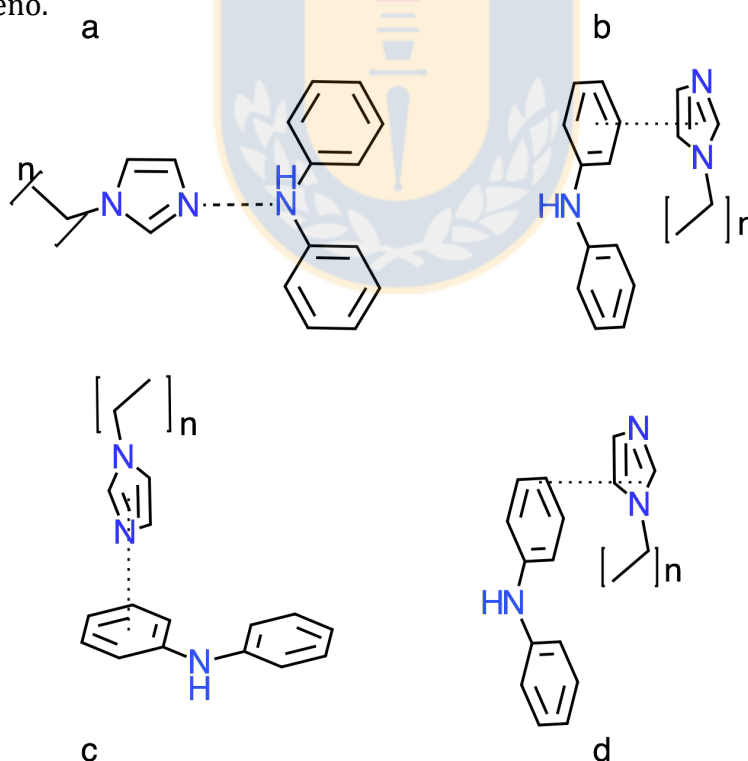


Fig. N°36. Esquema posible interacciones no enlazantes entre la unidad repetitiva VIm y la molécula DFA

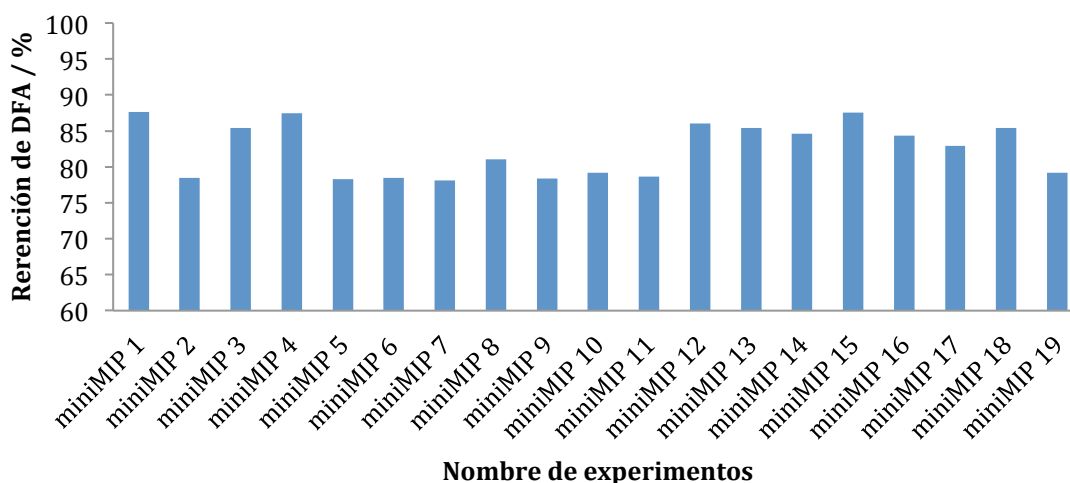


Figura N°37. Capacidades de Retención de DFA por los miniMIPs sintetizados en el sistema N°3.

Al analizar los resultados obtenidos en cuanto a la retención que presentan los miniMIPs sintetizados en el sistema 3 (ver figura 37), se puede apreciar que en este sistema se encuentra una dispersión similar a la del sistema 2. En este sentido los tres sistemas evaluados han presentado buenas capacidades de retener DFA a partir de una disolución patrón de 100 mgL⁻¹.

Al evaluar los miniMIPs del sistema 3 se observa que los miniMIPs 2, 5, 6, 7, 9, 11 presentan un mínimo de retención, el que está cercano a 78%. Al estudiar con detención estos 6 miniMIPs se puede apreciar que todos ellos tienen un factor en común, todos presentan la mínima cantidad de entrecruzador (50 mol% del monómero), hecho no puede ser una aleatoriedad, ya que se presenta en todos los miniMIPs, Está reportado que el entrecruzador es la unidad que confiere la rigidez al MIP; en otras palabras, es necesario para que los grupos funcionales del MIP estén estáticos, ya que si tienen algún grado de libertad de movimiento éstos se pueden reordenar lo que se reflejaría en que el sitio activo de la adsorción perdería sus capacidades de reconocimiento, que es lo que podría estar ocurriendo en estos seis casos.

Al evaluar los máximos de retención se encuentra que los experimentos denominados miniMIP 15, 16, 18 y 19 presentan los máximos de retención para el sistema 3. Estos cuatro miniMIPs, tienen parámetros en común. Los miniMIPs 15 y 16 presentan una máxima cantidad de entrecruzador (300 mol% del monómero) y una máxima cantidad de solvente (10 mL). Una alta cantidad de entrecruzador indica que los

grupos funcionales del sitio activo del MIP se mantienen rígidos, es decir, la forma del sitio activo no cambia, y una elevada cantidad de solvente permite la obtención de polímeros esféricos que presentan buenas áreas superficiales como materiales adsorbentes.

Por otra parte los miniMIPs 18 y 19 son repeticiones del mismo experimento, lo que indica que es un buen resultado su similitud en cuanto a la capacidad de retener DFA, ya que indica una buena reproducibilidad de este sistema. Cabe mencionar que los nanoMIPs 18 y 19 están sintetizados con las cantidades intermedias de los reactivos y el solvente es decir 20 mol% de plantilla, 175 mol% de entrecruzador, 2 mol % de iniciador y 6 mL de solvente.

En cuanto a la variación de los experimentos para el sistema 3, se aprecia que las tres repeticiones presentan porcentajes de retención muy similares, miniMIP 17 un 87,67 % miniMIP 18 un 86,01 y finalmente el miniMIP 19 un 84,36 % de retención de DFA. Obteniéndose un coef de variación de 4,14 %.

En la figura 38 se puede observar algunas de las posibles interacciones no enlazantes que se dan entre la unidad repetitiva del polímero (AAm) y DFA, que pueden ser fuerzas de dispersión de London o enlaces de hidrógeno o interacciones electroestáticas dependiendo de la carga del grupo amino que se puede comportar como una base y protonarse para estar cargado positivamente y el grupo carboxílico que se puede comportar como un ácido y recibir un par de electrones. La interacción más probable sería una interacción no enlazante atractiva mediante un enlace de hidrogeno.

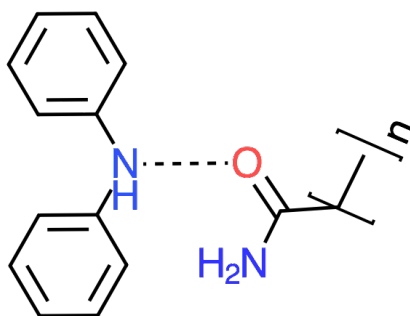


Figura N°38. Esquema de posible interacción no enlazante entre la unidad repetitiva AAm y la molécula DFA.

Según estos datos se puede observar que los MIPs sintetizados en base a vinilimidazol, vinilpirrolidona y acrilamida presentan una buena capacidad de retener DFA. Por otra parte, se observa que las distintas variables elegidas mediante un diseño de experimentos no afectan en mayor medida la retención de los MIPs, más si son muy importantes en el rendimiento de los sistemas. Es por esto que se hace un estudio más detallado de cómo se comporta el rendimiento de la reacción a medida que se varían los porcentajes de iniciador, entrecruzador, plantilla y solvente.

3.7. Análisis estadístico del Rendimiento de miniMIPs.

A continuación se presentan los resultados obtenidos mediante el diseño de experimentos. Utilizando esta herramienta se pueden encontrar los factores de la síntesis que son los más importantes y ver cómo interactúan entre ellos; para esto se realiza un diseño de experimentos en que se eligen los factores a tomar en cuenta, luego se elijen los márgenes de trabajo, el inferior se representa con un -1 y el superior se representa con un +1, luego de esto se realiza la grilla de experimentos, en este caso 19 en cada sistema y se trabajan los datos y las respuestas en un software adecuado.

En la tabla N°5 aparecen los factores seleccionados de acuerdo al modelo. Cabe mencionar que estos factores son 4: cantidad de plantilla utilizada, cantidad de monómero utilizado, cantidad de entrecruzador y cantidad de solvente. El diseño de experimentos en un diseño factorial simple de $2^k + 3$, siendo k el número de los factores. Por ende el número de experimentos distintos por cada sistema que se evaluó resultó ser 19. En la tabla N°7 aparecen especificados el número y el orden de los experimentos que se realizaron.

El objetivo principal de desarrollar un diseño experimental es optimizar un proceso con un mínimo de experimentos y considerando una o más respuestas con una dependencia multifactorial.

El diseño experimental involucra dos contextos:

1. Describe la serie de experimentos que será llevada a cabo con la intención de desarrollar un modelo predictivo (habitualmente un modelo lineal).
2. Se aplica para determinar la serie de condiciones óptimas que son requeridas para obtener un resultado con características deseables u óptimas.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para el análisis de los miniMIPs del sistema número 1.

Tabla N°12. Análisis de varianza para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 1.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Plantilla	0,0715562	1	0,0715562	0,00	0,9670
B:Entrecruzador	1815,4	1	1815,4	55,22	0,0176
C:Iniciador	307,213	1	307,213	9,34	0,0924
D:Solvente	463,433	1	463,433	14,10	0,0642
AB	144,3	1	144,3	4,39	0,1712
AC	5,82016	1	5,82016	0,18	0,7148
AD	111,566	1	111,566	3,39	0,2068
BC	56,8893	1	56,8893	1,73	0,3189
BD	1128,12	1	1128,12	34,31	0,0279
CD	375,294	1	375,294	11,41	0,0776
Falta de ajuste	696,201	6	116,033	3,53	0,2372
Error puro	65,7565	2	32,8782		
Total (corr.)	5170,06	18			

$R^2 = 85,2 \%$

Error estándar del est. = 5,7

Error absoluto medio = 5,2

La tabla N°12 es una tabla ANOVA que particiona la variabilidad de rendimiento en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen un valor P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%.

La prueba de falta de ajuste está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si se debiera usar un modelo más complicado. La prueba se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones obtenidas en condiciones repetidas de los factores. Dado que el valor-P para la falta de ajuste en la tabla ANOVA es mayor que 0,05, el modelo parece ser adecuado para los datos observados al nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 85,2% de la variabilidad en rendimiento. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 5,7. El error medio absoluto (MAE) de 5,2 es el valor promedio de los residuos.

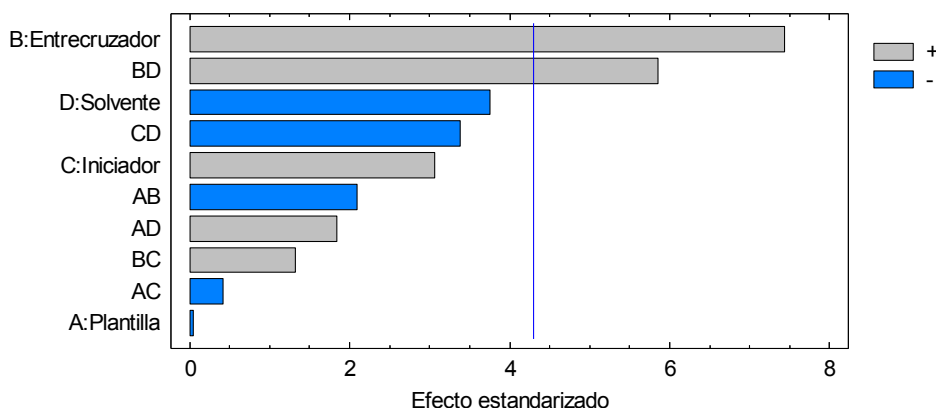


Figura N°39. Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de los miniMIPs del sistema 1 con respecto al rendimiento.

En la figura 39 se observa un diagrama de Pareto, el que, muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de magnitud. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado dividido por su error estándar. Esto es equivalente a calcular un estadístico-t para cada efecto. La línea vertical puede utilizarse para juzgar cuáles efectos son estadísticamente significativos. Cualquier barra que se extienda más allá de la línea corresponde a efectos que son estadísticamente significativos con un 95% de nivel de confianza. En este caso, 2 efectos son significativos, el entrecruzador y la interacción que se da entre el solvente y el entrecruzador.

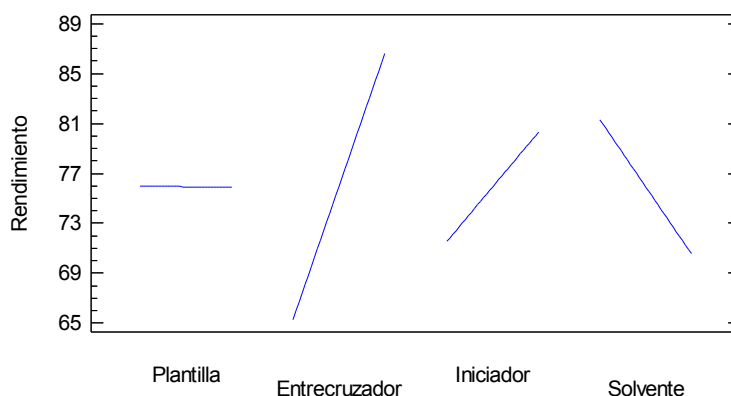


Figura N°40. Efectos principales para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 1.

La figura 40 muestra los estimados de rendimiento como una función de cada factor experimental. En cada gráfica, el factor de interés se varía de su nivel bajo a su nivel alto, mientras que los demás factores se mantienen constantes en sus valores centrales.

Así se puede observar que para los miniMIPs del sistema 1 la cantidad de plantilla no tiene una influencia significativa en el rendimiento, a diferencia del entrecruzador. Analizando este factor se puede apreciar que hay unas diferencias en cuanto al rendimiento de alrededor de 20 % al variar las cantidades de entrecruzador. El último factor analizado es la cantidad de solvente utilizado en las síntesis, se puede apreciar que a menor cantidad de solvente el rendimiento es mayor y viceversa.

A continuación despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos.

$$\text{Rendimiento} = 75,9 - 0,06 * P + 10,6 * E + 4,3 * I - 5,3 * S - 3,0 * P * E - 0,6 * P * I + 2,6 * P * S + 1,8 * E * I + 8,3 * E * S - 4,8 * I * S$$

Donde: P (Plantilla), E (Entrecruzador), I (Iniciador), S (Solvente).

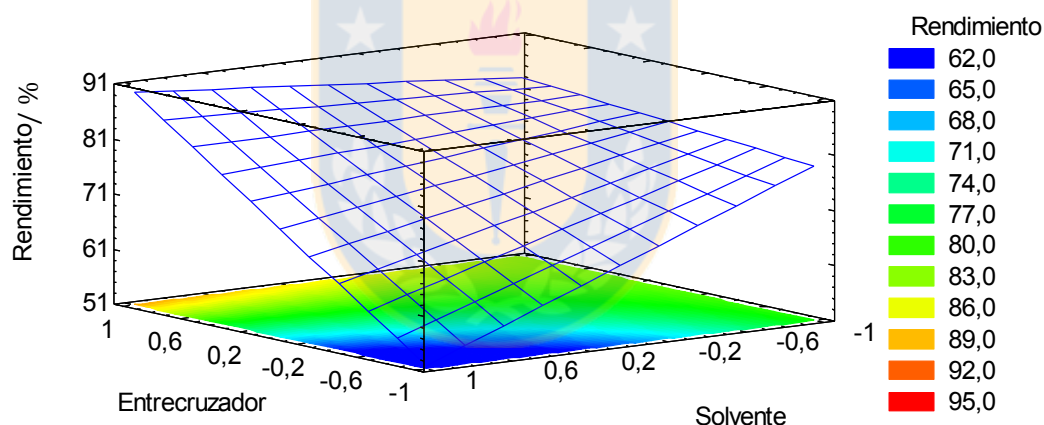


Fig. N°41. Superficie de respuesta estimada para evaluar el rendimiento de los miniMIPs del sistema 1 con respecto al entrecruzador y el solvente.

La figura 41 muestra la estimación de rendimiento en función de entrecruzador y solvente. La altura de la superficie representa los valores de Rendimiento, indicando que la máxima de rendimiento se obtiene al utilizar las mayores cantidades de entrecruzador.

Tabla N°13. Combinación de los niveles de los factores a la cual se maximiza el rendimiento de los miniMIPs del sistema 1.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Plantilla	-1,0	1,0	-1,0
Entrecruzador	-1,0	1,0	1,0
Iniciador	-1,0	1,0	1,0
Solvente	-1,0	1,0	-1,0

Finalmente en la tabla N°13 se observan los factores de la síntesis que maximizan el rendimiento de la síntesis de miniMIPs en el sistema 1: la cantidad óptima de plantilla es 10 mol % del monómero, la cantidad óptima de entrecruzador es 300 mol % del monómero, la cantidad óptima del iniciador es 3 mol % del monómero y la cantidad óptima del solvente es 2 mL del monómero.

A continuación se presentan los resultados del diseño experimental para los miniMIPs del sistema 2.

Tabla N°14. Análisis de varianza para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Plantilla	86,5754	1	86,5754	2,46	0,2574
B:Entrecruzador	1048,86	1	1048,86	29,79	0,0320
C:Iniciador	245,832	1	245,832	6,98	0,1183
D:Solvente	324,848	1	324,848	9,23	0,0934
AB	15,9472	1	15,9472	0,45	0,5703
AC	17,6593	1	17,6593	0,50	0,5522
AD	358,789	1	358,789	10,19	0,0857
BC	5,36836	1	5,36836	0,15	0,7338
BD	2,34543	1	2,34543	0,07	0,8205
CD	128,757	1	128,757	3,66	0,1960
Falta de ajuste	765,9	5	153,18	4,35	0,1974
Error puro	70,4083	2	35,2041		
Total (corr.)	3323,63	17			

$$R^2 = 74,8\%$$

Error estándar del est. = 5,9

Error absoluto medio = 5,7

La tabla N°14 es una tabla ANOVA que particiona la variabilidad de rendimiento en piezas separadas para cada uno de los efectos. Esta tabla nos indica que hay un efecto significativamente distinto que cero, con un nivel de confianza del 95 %. Este efecto es la variable entrecruzador.

La prueba de falta de ajuste está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si se debería usar un modelo más complicado. En este caso como la prueba de falta de ajuste es mayor a 0,05, indica que el modelo es el adecuado para los datos observados con un 95 % de confianza.

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 74,8% de la variabilidad en rendimiento. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 5,9. El error medio absoluto (MAE) de 5,7 es el valor promedio de los residuos.

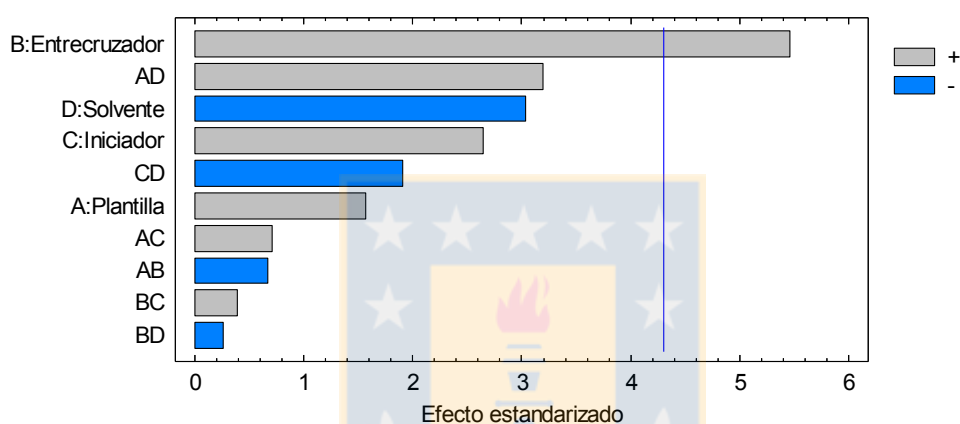


Figura N°42. Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de los miniMIPs del sistema 2 con respecto al rendimiento.

En la figura 42 se observa un diagrama de Pareto, que representa los efectos estandarizados en orden decreciente. La línea vertical ayuda a juzgar qué efectos son estadísticamente significativos con un 95 % de confianza. En este caso solo la variable entrecruzador es significativa para describir el rendimiento.

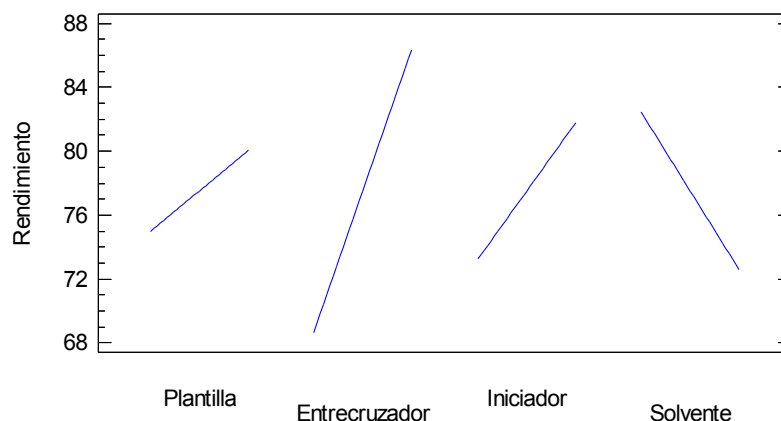


Figura N°43. Efectos principales para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2.

La figura 43. muestra los estimados de rendimiento como una función de cada factor experimental. En cada gráfica, el factor de interés se varía de su nivel bajo a su nivel alto, mientras que los demás factores se mantienen constantes en sus valores centrales.

En la figura 43 se pueden observar los efectos de las variables sintéticas seleccionadas sobre el porcentaje de rendimiento en la síntesis de MIPs. En el primer caso al evaluar la cantidad de molécula plantilla utilizada durante la síntesis se puede apreciar una pequeña dependencia del rendimiento con la cantidad de plantilla utilizada. Se puede ver que a menor cantidad de plantilla hay un menor rendimiento, y viceversa. Por otra parte la variable más significativa al igual que en el sistema 1 es la cantidad de entrecruzador observándose diferencias del orden de 20 % de rendimiento entre usar el mínimo o el máximo de entrecruzador. Al igual que en el sistema anterior las cantidades de iniciador y solvente siguen la misma relación.

A continuación se despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos

$$\text{Rendimiento} = 77,5 + 2,5 * P + 8,8 * E + 4,2 * I - 4,9 * S - 1,1 * P * E + 1,1 * P * I + 5,1 * P * S + 0,6 * E * I - 0,4 * E * S - 3,1 * I * S$$

Donde: P (Plantilla), E (Entrecruzador), I (Iniciador), S (Solvente).

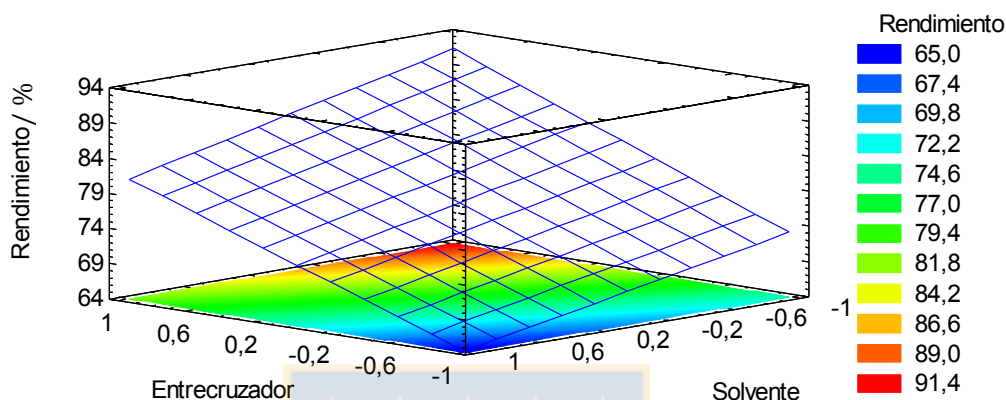


Figura N°44. Superficie de respuesta estimada para evaluar el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2 con respecto al entrecruzador y el solvente.

La figura 44 muestra la estimación de rendimiento en función de entrecruzador y solvente. La altura de la superficie representa los valores de Rendimiento. Los otros factores se mantienen constantes.

Tabla N°15. Combinación de los niveles de los factores a la cual se maximiza el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Plantilla	-1,0	1,0	-1,0
Entrecruzador	-1,0	1,0	1,0
Iniciador	-1,0	1,0	1,0
Solvente	-1,0	1,0	-1,0

Finalmente la tabla N°15 refleja los factores de la síntesis que maximizan el rendimiento de la síntesis de miniMIPs en el sistema 2: la cantidad óptima de plantilla es 10 mol % del monómero, la cantidad óptima de entrecruzador es 300 mol % del monómero, la cantidad óptima del iniciador es 3 mol % del monómero y la cantidad óptima del solvente es 2 mL del monómero. Un resultado similar al obtenido en el sistema 1.

A continuación se presentan los resultados del diseño experimental para los miniMIPs del sistema 3.

Tabla N°16. Análisis de varianza para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 3.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Plantilla	96,8748	1	96,8748	0,57	0,4707
B:Entrecruzador	1,21551	1	1,21551	0,01	0,9345
C:Iniciador	702,118	1	702,118	4,15	0,0759
D:Solvente	25,5278	1	25,5278	0,15	0,7077
AB	248,614	1	248,614	1,47	0,2598
AC	54,2801	1	54,2801	0,32	0,5864
AD	540,679	1	540,679	3,20	0,1115
BC	556,842	1	556,842	3,29	0,1070
BD	3412,02	1	3412,02	20,19	0,0020
CD	870,398	1	870,398	5,15	0,0529
Error total	1352,0	8	169,0		
Total (corr.)	7860,57	18			

R-cuadrada = 82,8%

Error estándar del est. = 13,1

Error absoluto medio = 6,5

La tabla N°16 es una tabla ANOVA que particiona la variabilidad de Rendimiento en piezas separadas para cada uno de los efectos. Esta tabla muestra que hay un efecto significativamente distinto de cero con un nivel de confianza del 95 %, este efecto es la interacción que hay entre el solvente y el entrecruzador.

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 82,8% de la variabilidad en Rendimiento. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 13,0. El error medio absoluto (MAE) de 6,5 es el valor promedio de los residuos.

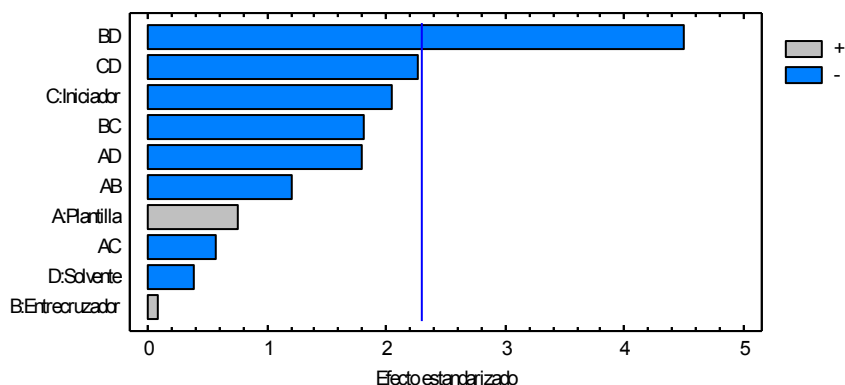


Figura N°45. Diagrama de Pareto para los efectos estandarizados de los miniMIPs del sistema 3 con respecto al rendimiento.

El diagrama de Pareto, que se observa en la figura 45 muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de magnitud. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado dividido entre su error estándar. Esto es equivalente a calcular un estadístico-t para cada efecto. La línea vertical puede utilizarse para juzgar cuáles efectos son estadísticamente significativos. Cualquier barra que se extienda más allá de la línea corresponde a efectos que son estadísticamente significativos con un 95,% de nivel de confianza. En este caso, un efecto es significativo (la interacción entre la cantidad de solvente y el entrecruzador).

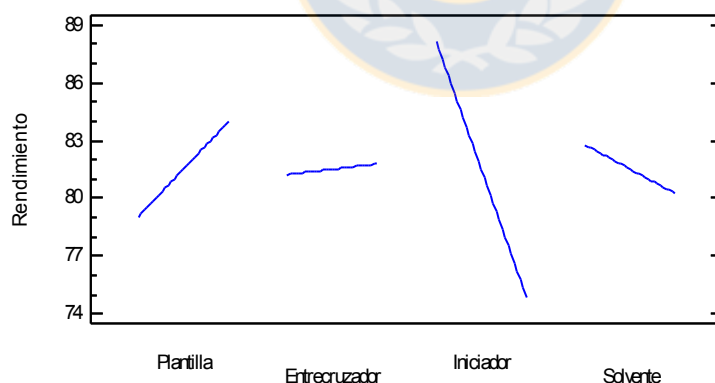


Figura N°46. Efectos principales para el rendimiento de los miniMIPs del sistema 2

Al evaluar los efectos principales de las variables sintéticas seleccionadas sobre el porcentaje de rendimiento (ver figura 46) se puede apreciar que hay diferencias significativas en comparación a los sistemas evaluados recientemente. La principal diferencia entre los sistemas evaluados anteriormente y éste, es la influencia del entrecruzador, se puede ver que el entrecruzador para este sistema no es tan

relevante como en los casos anteriores, aquí se ve que la cantidad de entrecruzador no influye mayormente en el porcentaje de la síntesis de MIPs. Por otra parte se puede ver que la variable más influyente es la cantidad de iniciador que indica que a medida que la cantidad de iniciador aumenta el porcentaje de rendimiento disminuye y viceversa.

A continuación se despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos.

$$\text{Rendimiento} = 81,5 + 2,4 * P + 0,2 * E - 6,6 * I - 1,2 * S - 3,9 * P * E - 1,8 * P * I - 5,8 * P * S - 5,8 * E * I - 14,6 * E * S - 7,3 * I * S$$

Donde: P (Plantilla), E (Entrecruzador), I (Iniciador), S (Solvente).

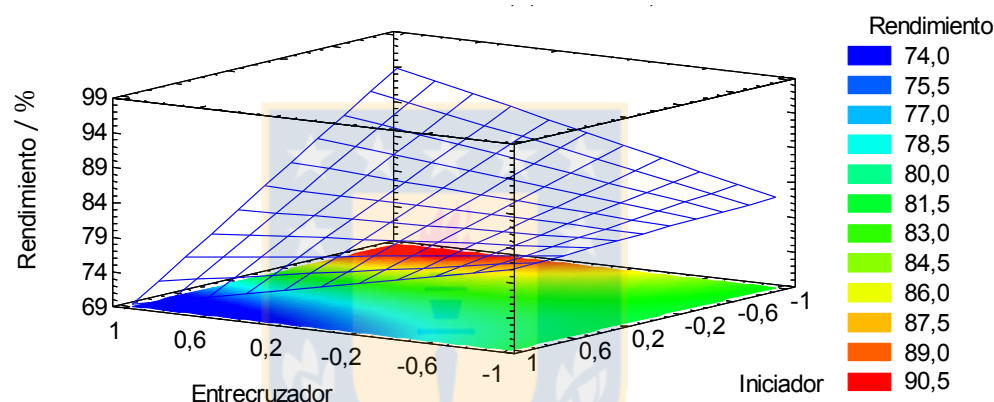


Figura N°47. Superficie de respuesta estimada para evaluar el rendimiento de los miniMIPs del sistema 3 con respecto al entrecruzador y el iniciador.

La Fig. 46 muestra la estimación de rendimiento en función de entrecruzador e iniciador. La altura de la superficie representa los valores de rendimiento. Los otros factores se mantienen constantes.

Tabla N°17. Combinación de los niveles de los factores a la cual se maximiza el rendimiento de los miniMIPs del sistema 3.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Plantilla	-1,0	1,0	1,0
Entrecruzador	-1,0	1,0	1,0
Iniciador	-1,0	1,0	-1,0
Solvente	-1,0	1,0	-1,0

La tabla N°17 refleja los factores de la síntesis que maximizan el rendimiento de la síntesis de miniMIPs en el sistema 3, como se puede apreciar en el diagrama de

Pareto y en la superficie de respuesta en el sistema 3 el entrecruzador no es el factor más importante, dando paso a la cantidad de iniciador, como el factor que estadísticamente influye más en el rendimiento de las síntesis de miniMIPs del sistema 3. Las cantidades óptimas que maximizan el rendimiento en este sistema son, cantidad óptima de plantilla es 30 mol %, la cantidad óptima de entrecruzador es 300 mol % del monómero, la cantidad óptima del iniciador es 1 mol % del monómero y por último la cantidad óptima del solvente es 2 mL.

3.8. Estudio de retención de MIPs y NIPs.

No se pudo hacer un estudio estadístico de la retención de DFA por parte de los miniMIPs debido a que la retención de DFA fue muy similar en los 19 miniMIPs de cada sistema, debido a esto no se encontró ninguna variable que fuera estadísticamente significativa para describir el rendimiento. Por esta razón se procedió a hacer un análisis de la retención solo con los MIPs sintetizados en mayor cantidad.

Como se mencionó anteriormente las resinas que presentaron una buena correlación entre su rendimiento y retención, se sintetizaron en mayor cantidad, en este sentido se seleccionaron 3 miniMIPs por sistema es decir 9 MIPs en total. En este punto, a su vez se sintetizaron los blancos de las síntesis denominados NIPs. Una vez obtenidas las nuevas resinas se debe conocer la capacidad de retención de DFA. Para conocer la capacidad de retención de MIPs y NIPs se utilizó espectroscopia UV-VIS. La curva de calibración utilizada se presenta en la figura 32.

A continuación se presentan los resultados de los estudios de capacidad de retención de los MIPs y NIPs 1-9.

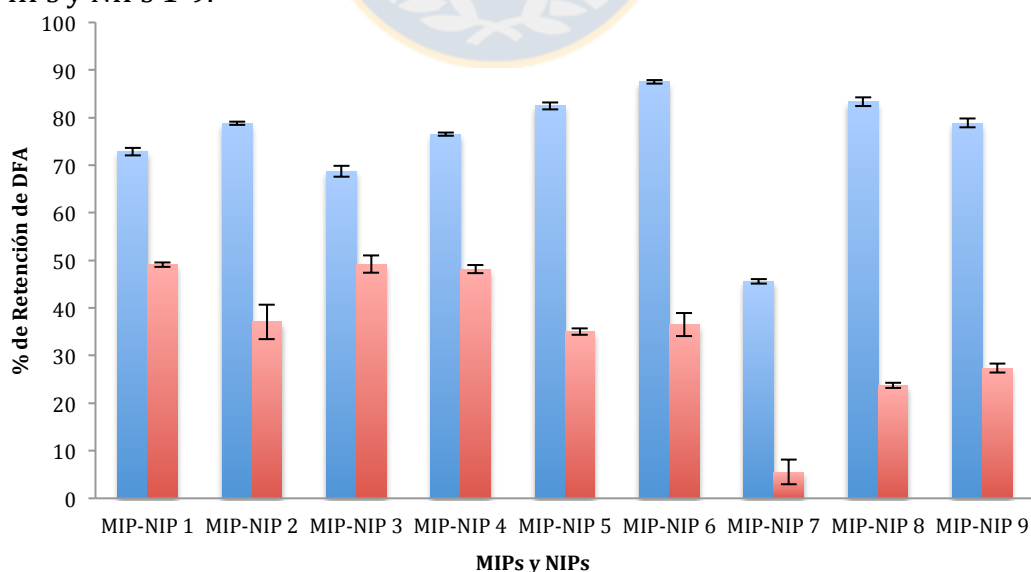


Figura N°48. Porcentajes de retención de DFA en MIPs y NIPs para los 3 sistemas seleccionados. Las barras de error corresponden a ± 1 la desviación estándar.

Como se puede apreciar en la figura 48 se comparan las capacidades de retener DFA por parte de todos los MIPs sintetizados. Para realizar esto se mezclan 10 mL de una solución que contiene 100 mgL^{-1} de DFA con 100 mg de cada MIP y NIP correspondiente.

En azul se pueden observar las capacidades de retención de DFA por parte de los MIPs y en rojo las capacidades de retención de DFA por parte de los NIPs. Lo primero que resalta es que en los 9 casos los MIPs retienen más DFA que los NIPs, lo que es un resultado que se condice con las hipótesis del trabajo, ya que demuestra que hay formación de cavidades, a las que se atribuyen los procesos de reconocimiento molecular en los MIPs. Como se puede observar prácticamente todos los NIPs (blancos de los experimentos) presentan capacidades de retener DFA. Aun más en el NIP 1, 3 y 4 esta capacidad de retener DFA está cercana al 50 %, fenómeno que puede deberse a la porosidad de los NIPs. Al estar sintetizados con el mismo solvente y en general bajo las mismas condiciones de síntesis que los MIPs, los NIPs presentan una morfología superficial similar, lo que puede dar una explicación a la capacidad de adsorción de DFA.

Al evaluar los MIPs y NIPs del sistema 1 se puede ver la uniformidad que los MIPs 1, 2 y 3 presentan en sus capacidades de retención de DFA, el MIP 1 presenta una retención de DFA del 73 %, el MIP 2 del 79 % y el MIP 3 un 68 %. El MIP 1 está compuesto por: 10 mol % de plantilla, un 300 mol % de entrecruzador, 3 mol % de entrecruzador y 10 mL de solvente, el MIP 2 tiene las cantidades intermedias es decir 20 mol % de plantilla, 175 mol % de entrecruzador, 2 mol % de iniciador y 6 mL de solvente. Por último el MIP 3 está compuesto por 30 mol % de plantilla, un 50 mol % de entrecruzador, un 1 mol % de iniciador y 10 mL de solvente.

Al hacer un análisis de la retención del sistema 1 se puede mencionar que el MIP 3 es el que presenta una menor capacidad de retener DFA, lo que es consecuente con resultados anteriores, ya que a menor cantidad de entrecruzador menor capacidad de retener el analito, lo que puede deberse a la falta de rigidez de los grupos funcionales en los sitios activos del MIP respectivo. También se observa que el MIP que tiene mejores capacidades de retener DFA es el MIP 2, que está sintetizado con las cantidades intermedias de los reactivos y el solvente, lo que puede indicar que la interacción entre la platilla, el solvente y el entrecruzador es óptima en las concentraciones intermedias.

Al analizar las capacidades de retención con respecto a los blancos (NIPs), el resultado indica que el MIP 1 retiene 1,49 veces más DFA que el NIP 1. El MIP 2 retiene 2,14 veces más DFA que el NIP 2 y que el MIP 3 retiene 1,39 veces más DFA que el NIP 3.

Estos resultados demuestran que el mejor MIP del sistema 1 en términos de retención de DFA es el número 2, ya que es el que se diferencia más entre la capacidad de MIP y NIP. Por otra parte también demuestra que la morfología del material es decir si es un MIP en forma de esferas como el MIP 1 y 3 o es un MIP rígido y amorfo como el MIP 2 no es tan trascendente como se esperaba en un principio, ya que el MIP 2 es totalmente rígido y heterogéneo, pero está compuesto por nanopartículas de forma esférica. Esto podría indicar que la forma de la micropartícula no es tan importante al momento de analizar la retención que presentan los MIPs.

Al evaluar los MIPs y NIPs del sistema 2 se puede apreciar que los MIPs correspondientes a este sistema son los que presentan la mayor capacidad de retener DFA entre todos los MIPs de los tres sistemas, esto se puede deber a la suma de interacciones no enlazantes que presenta la unidad repetitiva del sistema 2 con DFA, que es mayor en términos de cantidad comparada con las interacciones de los otros dos sistemas. El MIP 4 presenta una retención de DFA del 77 %, el MIP 5 un 83 % y el MIP 6 un 88 %. Para comprender mejor estos resultados hay que entender como es la composición de estos polímeros. El MIP 4 se compone de un 30 mol % de plantilla, un 50 mol % de entrecruzador, un 3 mol % de iniciador y 10 mL de solvente. El MIP 5 se compone de 10 mol % de plantilla, un 300 mol % de entrecruzador, un 3 mol % de iniciador y 2 mL de solvente. Por último, el MIP 6 se compone de las cantidades intermedias es decir un 20 mol % de plantilla, un 175 mol % de entrecruzador, un 2 mol % de iniciador y 6 mL de solvente.

Al evaluar la retención de los MIPs con respecto a su composición es interesante ver que se repiten patrones que ya se han observado previamente, por ejemplo la mínima retención del sistema 2 se observa en el MIP 4 que se compone de la mínima cantidad de entrecruzador, al igual que el sistema 1. Nuevamente esto se puede explicar debido a la rigidez de los grupos funcionales responsables de la adsorción en la cavidad creada, otro parámetro en común se obtiene entre el MIP 5 y el MIP 2, en términos de la morfología de los MIPs, es apreciable que ambos MIPs son rígidos, empaquetados y heterogéneos, pero al momento de evaluar sus capacidades de adsorción de la DFA estas son elevadas incluso más que las de sus pares, lo que nuevamente indica que una morfología heterogenea y no esférica no afecta en mayor medida la retención del analito en cuestión. Por último el MIP 6 es el que presenta una mayor capacidad de retener DFA con un 88 % de retención. Este MIP está sintetizado con las cantidades intermedias de los reactivos y el solvente, en el sistema 1 el MIP que presentó mejores capacidades de retener DFA fue el MIP 2, que también estaba sintetizado con las cantidades intermedias de reactivos y solventes. Por ende parece existir una relación entre las mejores capacidades de retener DFA y las cantidades intermedias de la síntesis.

Al comparar la retención de DFA por los MIPs con las retenciones de los NIPs se observa que el MIP 4 retiene 1,61 veces más que el NIP 4. El MIP 5 retiene 2,37 veces más que el NIP 5, y por último el MIP 6 retiene 2,44 veces más que el NIP 6. Nuevamente se observa que la mayor diferencia en cuanto a la retención de MIP y NIP se encuentra en los polímeros sintetizados con cantidades intermedias de reactivos y solvente, al igual que en caso del sistema 1 con el MIP y NIP 2.

Por último al evaluar los MIPs y NIPs del sistema 3 se observan los resultados más disímiles respecto a los MIPs del sistema 1 y 2. Se puede apreciar que el MIP 7 presenta una retención menor que la de todos sus pares con un 45 % de retención de DFA: el MIP 7 presenta un 83 % de retención de DFA y por último el MIP 9 presenta un 78 % de retención de DFA, lo que indica las buenas propiedades de extractor en fase sólida que estos polímeros pueden tener. Al observar la composición de los MIPs se pueden obtener más conclusiones. El MIP 7 está compuesto por 30 mol % de plantilla, 50 mol % de entrecruzador, 1 mol % de iniciador y 10 mL de solvente. El MIP 8 está compuesto por 10 mol % de plantilla, 300 mol % de entrecruzador, 1 mol % de iniciador y 10 mL de solvente, por último es MIP 9 está compuesto por las cantidades intermedias de la síntesis que son 20 mol % de plantilla, 175 mol % de entrecruzador, 2 mol % de iniciador y 6 mL de solvente. La primera similitud que surge es que el MIP 3 y el MIP 7 que presentan la misma composición porcentual de reactivos y solvente son los que presentan en términos porcentuales las menores retenciones de DFA de los 9 MIPs estudiados, lo que puede estar nuevamente relacionado con la cantidad de entrecruzador utilizado. Una segunda similitud se encuentra entre el MIP 9 y el MIP 6 (ambos sintetizados con las mismas proporciones de reactivos y solvente): presentan una morfología muy similar y capacidades de retener DFA dentro del mismo orden.

Al comparar la retención de DFA mediante los MIPs y comparándolas con las retenciones de los NIPs se observa que el MIP 7 retiene 9 veces más que su blanco siendo esta la mayor diferencia que se observa en los 9 MIPs y NIPs estudiados. El MIP 8 retiene 3,51 veces más que el NIP 8, y por último el MIP 9 retiene 2,9 veces más que el NIP 9. Estos resultados que están dentro de los márgenes que se han visto previamente y demuestran que hay sitios de unión en los MIPs, y que estos se deben al proceso de síntesis y más ciertamente a las interacciones que se dan entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales durante el proceso de síntesis.

Con el objetivo de obtener una visión más profunda de la capacidad de retener DFA por parte de los MIPs y NIPs seleccionados se realizaron experimentos de isotermas de adsorción y estudios cinéticos.

3.9. Estudios cinéticos.

Con el fin de entender mejor la adsorción de la DFA en los MIPs se realizaron estudios cinéticos. Estos estudios ayudan a entender el tiempo de contacto que tiene que tener la DFA en presencia de los MIPs para adsorberse en los polímeros.

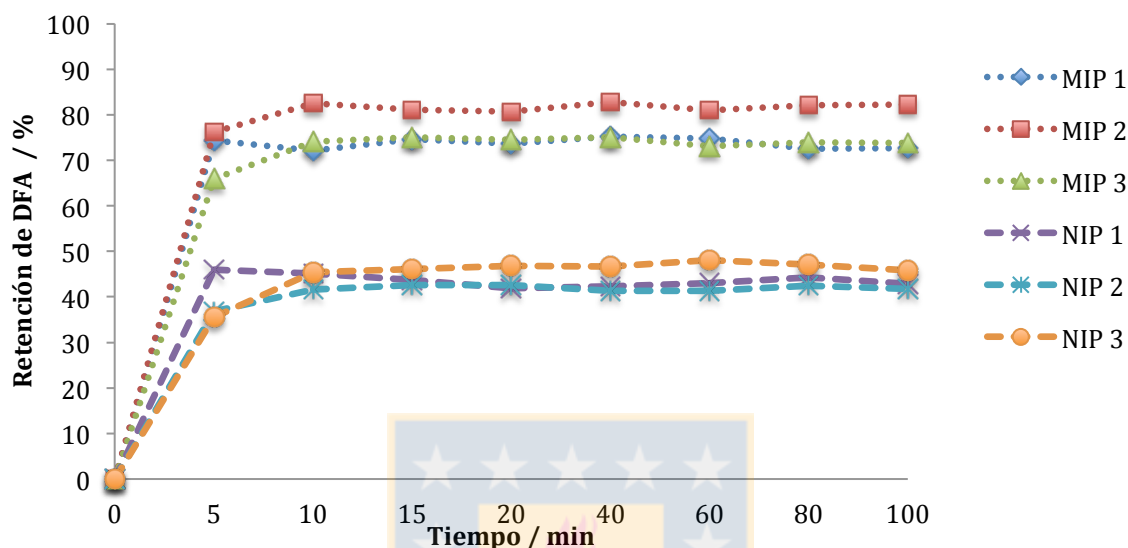


Figura N°49. Evaluación del tiempo de retención de DFA por parte de MIPs 1, 2 y 3 y NIPs 1, 2 y 3.

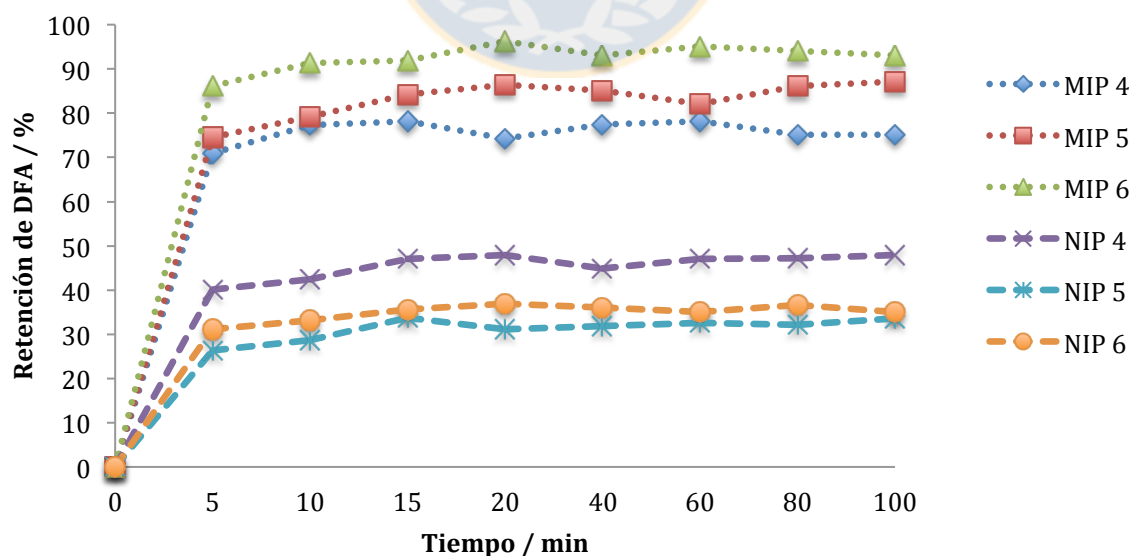


Figura N°50. Evaluación del tiempo de retención de DFA por parte de MIPs 4, 5 y 6 y NIPs 4, 5 y 6.

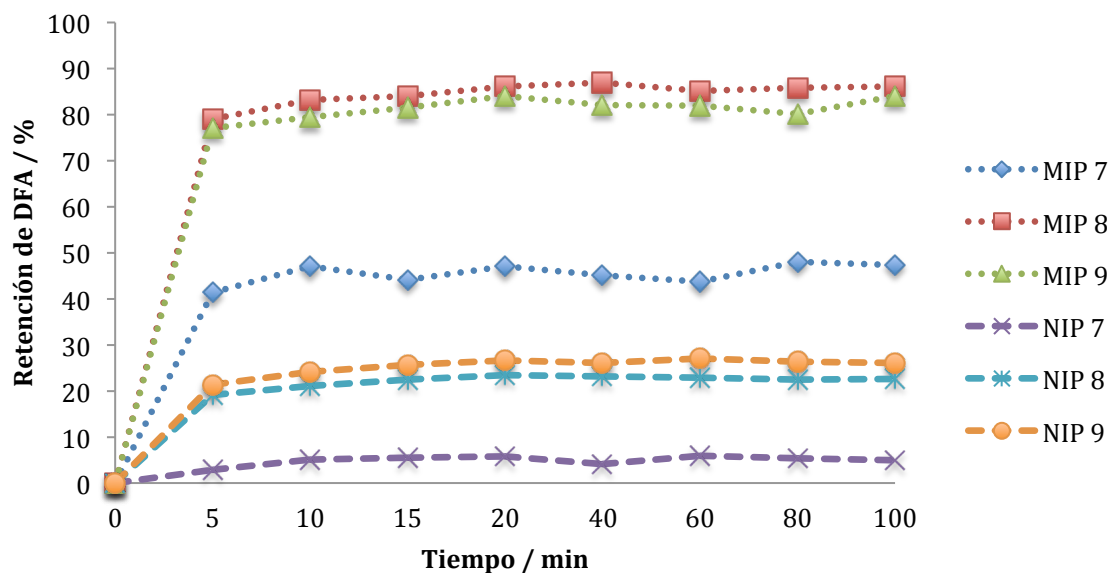


Fig. N°51. Evaluación del tiempo de retención de DFA por parte de MIPs 7, 8 y 9 y NIPs 7, 8 y 9.

Las figuras 49, 51 y 51, corresponden a los estudios cinéticos de los MIPs y NIPs 1-3, 4-6 y 7-9 respectivamente. En estas figuras se puede observar que en todos los casos la adsorción de DFA es rápida, y que el equilibrio se alcanza en todos los casos.

En la Fig. 48 es posible observar el comportamiento de los MIPs y NIPs 1, 2 y 3 respectivamente en relación a sus capacidad de tener DFA con respecto al tiempo. Se puede apreciar que la retención de los MIPs alcanza el equilibrio antes de los 10 minutos de contacto, lo que indica que estos materiales pueden presentar buenas características para su uso como extractor en fase sólida. Por parte se puede apreciar que la retención de DFA está en el mismo rango que se estudio en la sección 3.7, lo que es un indicativo de la reproducibilidad en el análisis que se logra con estos materiales. Algo muy similar ocurre con los NIPs 1, 2 y 3, en los que se puede observar que en general antes de los 20 minutos de contacto con la DFA se logra el máximo equilibrio. En promedio la diferencia porcentual en cuanto a la retención de DFA en MIPs 1, 2 y 3 y NIPs 1, 2 y 3, está cercana al 35 %, es decir, en promedio los MIPs retienen un 35 % más que los NIPs.

En la figura 50 se observa el comportamiento de los MIPs y NIPs 4, 5 y 6 respectivamente y al igual que en el caso anterior el equilibrio de la adsorción de DFA se alcanza antes de los 20 minutos de contacto se puede apreciar una uniformidad en cuanto a la retención de los MIPs y NIPs con respecto al tiempo, cuando se compara con la retención de estos en la sección 3.7. Al comparar las diferencias porcentuales en

la retención de DFA por parte de MIPs y NIPs se observa una diferencia cercana al 45 %. Se puede apreciar que hay una buena retención por parte de los polímeros del sistema 2 que están sintetizados con el monómero VIm ya que este monómero puede presentar una cantidad considerable de interacciones no enlazantes con la DFA.

La figura 51 corresponde a los estudios cinéticos de la adsorción de DFA por parte de MIPs y NIPs 7, 8 y 9. Al igual que los en casos estudiados previamente se puede observar que antes de los 10 minutos de contacto entre la solución de DFA y los polímeros respectivos se alcanza el equilibrio, lo que indica que estos polímeros podrían ser utilizados en extracción en fase sólida para adsorber DFA. Es interesante que nuevamente la adsorción de DFA por parte de MIPs y NIPs, está cercana a la obtenida en los experimentos de la sección 3.7, lo que es un buen indicio de la reproducibilidad en cuanto a la retención de DFA por parte de los polímeros.

3.10. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN.

3.10.1. Isotermas de adsorción.

Para determinar la capacidad máxima de adsorción de los polímeros y obtener ciertos parámetros de unión entre DFA y los polímeros, se obtuvieron isotermas de adsorción para MIPs y NIPs. Una vez obtenidas las isotermas estas se ajustaron a dos modelos de isotermas, Isotermas de Freundlich e isotermas de Langmuir. Con los datos obtenidos de las isotermas se graficaron las expresiones lineales de cada modelo para luego calcular los parámetros asociados a dichas isotermas.

Para obtener las isotermas de adsorción se representa gráficamente la capacidad de adsorción Q_e (mg/g) frente a la concentración de DFA en el equilibrio (molL^{-1}).

En la bibliografía se puede encontrar una basta cantidad de isotermas de adsorción medidas sobre una amplia variedad de sólidos porosos. A pesar de tal diversidad la mayoría de estas isotermas, las cuales son el resultados de una adsorción física, pueden ser agrupadas convenientemente en seis clases según la clasificación de la IUPAC. (ver figura 52) Los primeros cinco tipos de la clasificación (I a V) fueron propuestos originalmente por Brunauer S., Deming L. S., Deming W. S. y Teller E. y es conocida como la clasificación BDDT 3, también referenciada como clasificación de Brunauer.

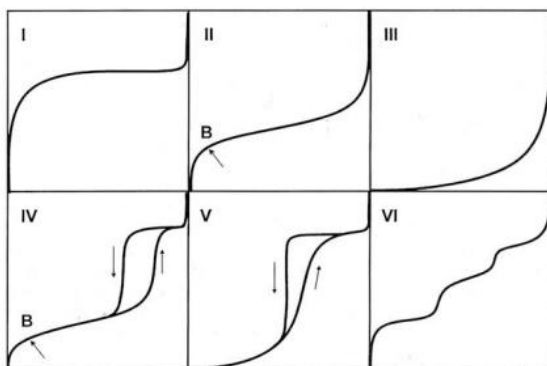


Figura N°52. Clasificación de isotermas de adsorción BDDD.

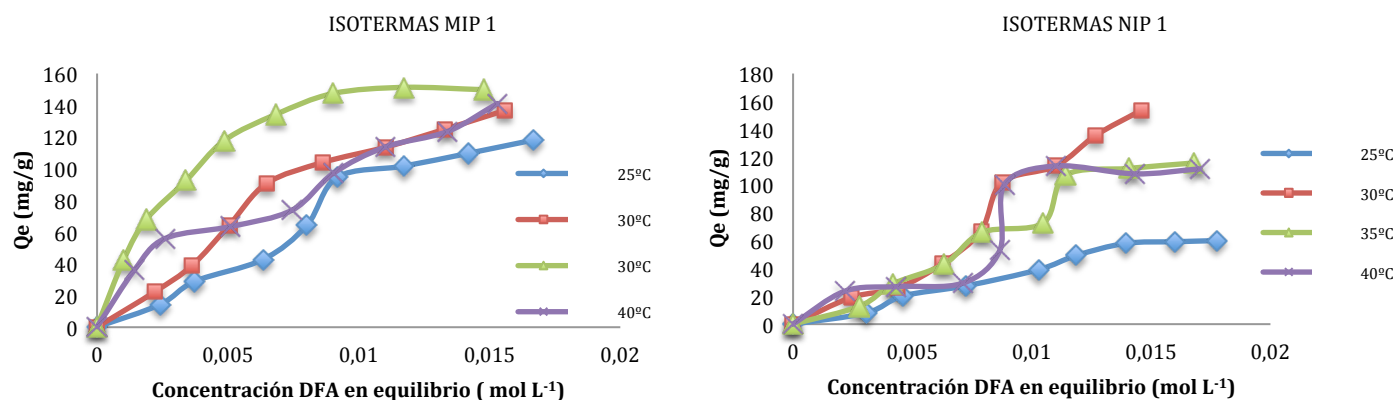


Figura N°53. Isotermas de Adsorción para MIP y NIP 1 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40 °C.

En la figura 53 se pueden observar las isotermas de adsorción a 4 temperaturas para el MIP 1 y el NIP 1. En una primera instancia se puede observar que el MIP 1 presenta 2 tipos de isotermas de adsorción marcadas. A 25, 30 y 40 °C se aprecia una isoterma tipo IV, que representa una adsorción en multicapa característica de partículas con distintos tamaños de poros. Esta isoterma a su vez representa una adsorción física en multicapas, con energías de enlace que no superan los 20 kJmol⁻¹. A 35°C se observa un fenómeno de adsorción relativamente distinto; se puede ver que la forma de la isoterma es distinta y adopta una forma tipo I, tipo de isoterma que se conoce como isoterma de Langmuir, y es característica de adsorciones físicas donde se forma una monocapa. En cambio los NIPs 1 en todas las temperaturas estudiadas presentan un solo tipo de isoterma de adsorción una adsorción tipo IV, este fenómeno se puede deber a que la adsorción en los NIPs solo se debe a que el adsorbato (DFA), se absorbe en el adsorbente (NIPs) solamente debido a la porosidad de éste, y no debido a una atracción química o física, como en el caso de los MIPs.

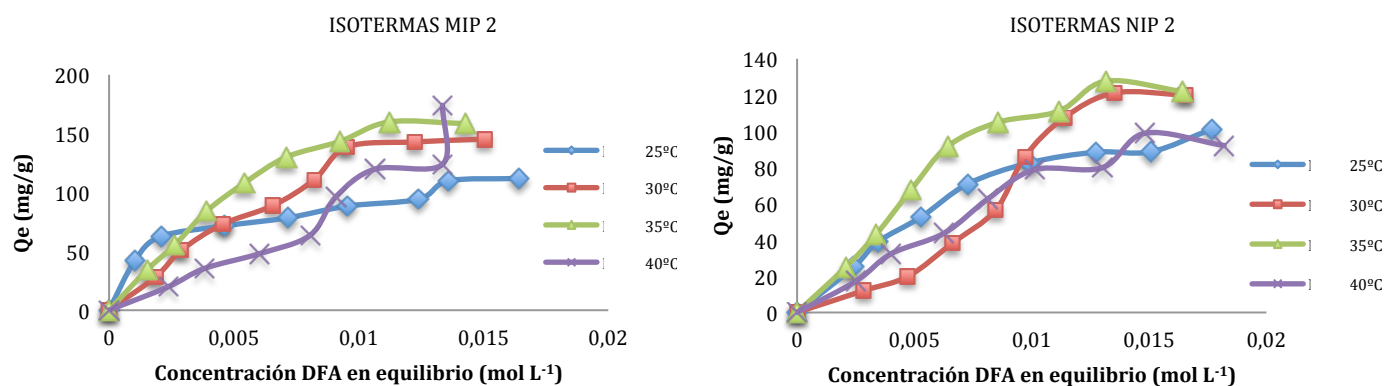


Figura N°54. Isotermas de Adsorción para MIP y NIP 2 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40 °C.

Al estudiar la figura 54 se pueden observar las isotermas de adsorción para MIPs 2 y NIPs 2. Al estudiar el MIP 2 se puede observar que a 25, 30 y 35 °C la isoterma que se obtiene es del tipo I nuevamente, lo que predice la formación de una monocapa de DFA que se adsorbe físicamente sobre el polímero. A 40°C se observa una isoterma tipo VI, tipo de isoterma que se asocia a una adsorción capa por capa, hasta que se alcanza el equilibrio.

Al evaluar las isotermas que se obtienen para el NIP 2 es posible observar que a las cuatro temperaturas estudiadas se obtienen perfiles de adsorción que corresponden a una isoterma tipo IV, lo que corresponde a una adsorción multicapa.

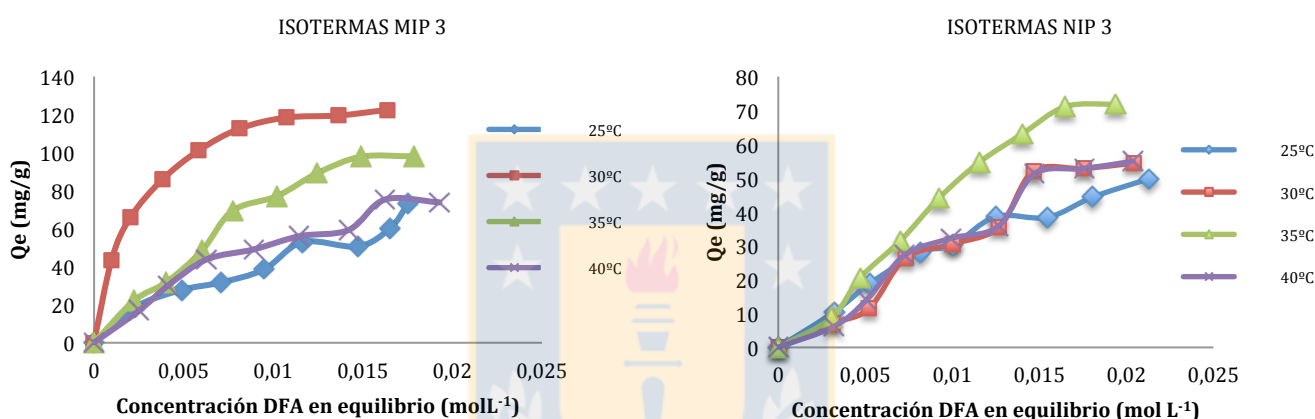


Figura N°55. Isotermas de Adsorción para MIP y NIP 3 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.

La figura 55 muestra las isotermas de adsorción para MIPs 3 y NIPs 3. Al estudiar los fenómenos de adsorción que ocurren para el MIP 3 se puede apreciar que estos se pueden separar en dos grupos: a 30 y 35 y 40°C se observan isotermas que corresponden a isotermas tipo I, que siguen la formación de monocapas de DFA adsorbidas sobre el MIP y a 40°C se puede apreciar una isoterma tipo IV que sigue la formación de multicapas adsorbidas físicamente debido a los distintos tipos de poros que se encuentran en el MIP. Al evaluar los fenómenos de adsorción que ocurren en el NIP 3 se puede observar nuevamente que a las 4 temperaturas estudiadas el NIP 3 sigue un proceso de adsorción del tipo IV, lo que nuevamente indica que la adsorción física que ocurre en el NIP es debido solamente a los poros que presenta el polímero, mas no a un fenómeno de reconocimiento propiamente tal.

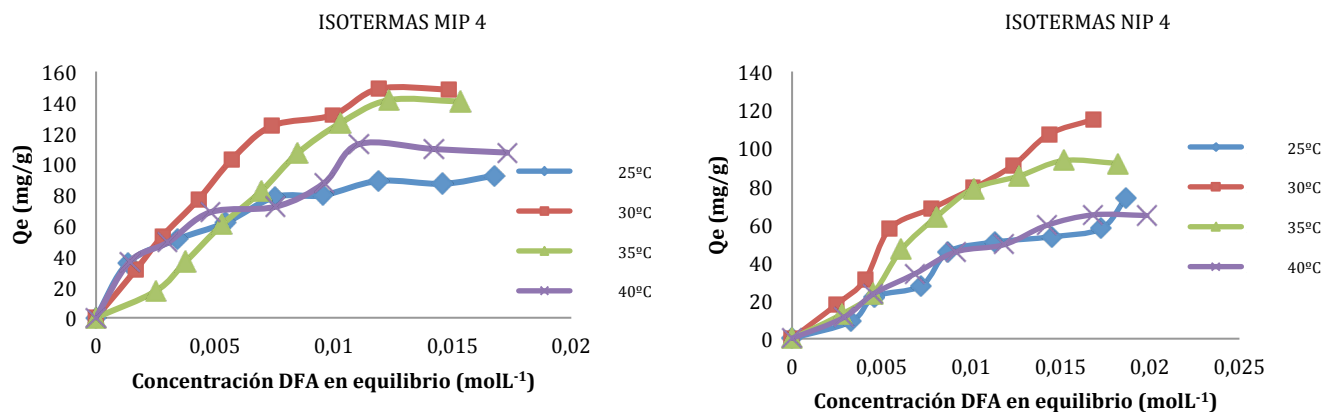


Fig. N°56. Isotermas de Adsorción para MIP y NIP 4 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.

La figura 56 muestra las isotermas de adsorción realizadas para MIPs 4 y NIPs 4. Al observar las isotermas para el MIP 4 se puede apreciar que las isotermas realizadas a 20, 25 y 30 °C siguen una adsorción física del tipo I, que corresponde a la formación de una monocapa de adsorbente sobre el adsorbato. Cabe destacar que la formación de esta monocapa es más rápida a 25°C, lo que se traduce en la obtención de un *plateau* a una mayor velocidad que los otros dos casos. A 40°C se puede observar una isoterma tipo VI, que representa una adsorción física en multicapas, hasta que se alcanza el equilibrio. Al estudiar los NIPs a las cuatro temperaturas se pueden estimar tres tipos de adsorción diferentes: a 25°C se puede observar un fenómeno de adsorción correspondiente a una isoterma tipo VI, que corresponde a adsorciones físicas en forma de multicapas, a 30 y 35°C se pueden apreciar fenómenos de adsorción que corresponden a una adsorción tipo IV, que corresponde a una adsorción física en multicapas característico de superficies porosas. Por último a 40 °C se observa una adsorción que puede corresponder a una adsorción tipo I.

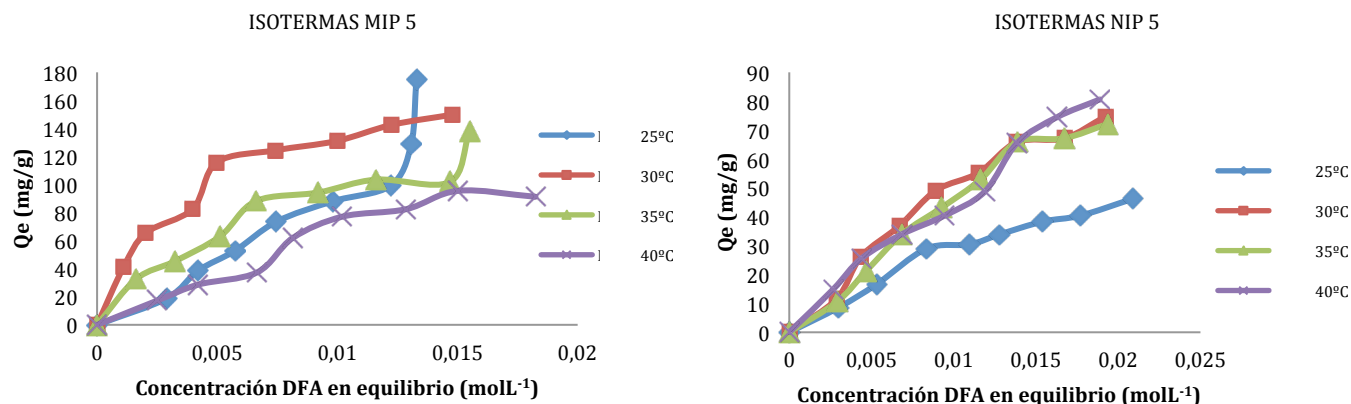


Fig. N°57. Isotermas de Adsorción para MIP y NIP 1 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.

En la figura 57 se presentan las isotermas de adsorción que se obtienen para los MIPs 5 y los NIPs 5. Al estudiar los fenómenos de adsorción que ocurren en los MIPs se pueden diferenciar dos grupos de isotermas. A 25 y 35°C se observan isotermas del tipo II, que son indicativas de una adsorción en multicapa. El rápido ascenso inicial corresponde a la formación de la primera capa. Al seguir aumentando la concentración de adsorbato se forma la segunda capa de moléculas adsorbidas. Por otra parte a 30 y 40°C se observan isotermas de adsorción del tipo IV, que son características para la adsorción física de adsorbentes en sólidos porosos.

Al estudiar los fenómenos de adsorción que se observan en los NIPs 5 se puede apreciar que en las isotermas a las cuatro temperaturas no se alcanza un *plateau* bien definido, esto se puede deber a los fenómenos de adsorción que presenta este material. A las cuatro temperaturas parece haber un fenómeno de adsorción característico para el tipo IV, el que nuevamente presenta adsorción en forma de multicapas físicas, para materiales porosos. Esto se puede explicar debido a que la adsorción de la DFA se da solo en los poros del material, y no hay algún fenómeno de adsorción más específico.

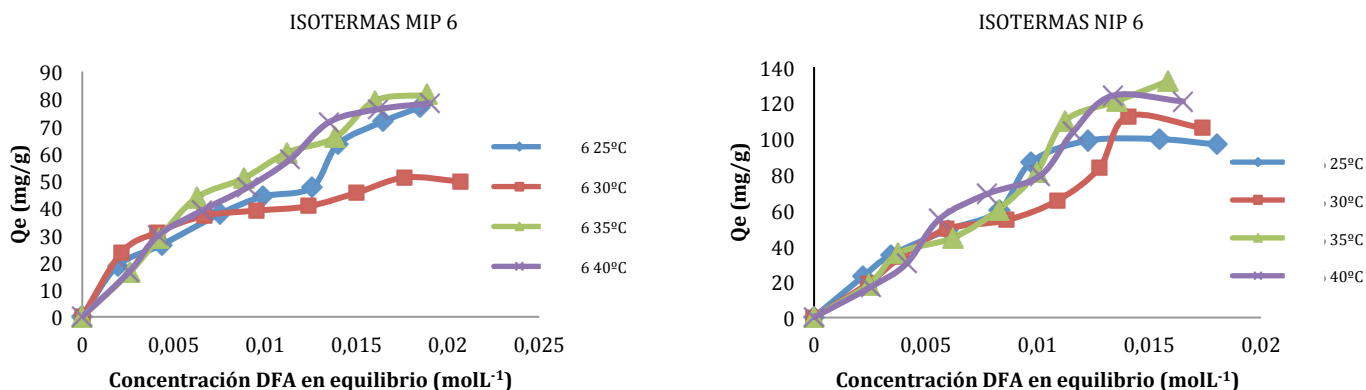


Fig. N°58. Isotermas de Adsorción para MIP y NIP 6 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.

En la figura 58 se pueden observar los fenómenos de adsorción para los MIPs 6 y NIPs 6. Al Observar las isotermas de adsorción para los MIPs, éstas se pueden diferenciar en dos grupos, a 25°C: Adsorción tipo IV, característica de adsorciones físicas en forma de multicapas en sólidos porosos. Por otra parte a 30, 35 y 40°C se observa una isoterma del tipo II, en la que DFA cubre al MIP, hasta que se forma una monocapa, proceso que continúa hasta que se obtiene una segunda monocapa de DFA. Éste es un perfil frecuente en procesos de adsorción física.

Al estudiar los NIPs se puede apreciar que a las 4 temperaturas estudiadas hay fenómenos de adsorción que se pueden catalogar como tipo IV, lo que indica que hay una adsorción física en forma de multicapas que se da en sólidos porosos, hasta alcanzar el equilibrio, esto indica que la adsorción de DFA en los NIPs se debe solo a la porosidad del material y no a algún tipo de interacción.

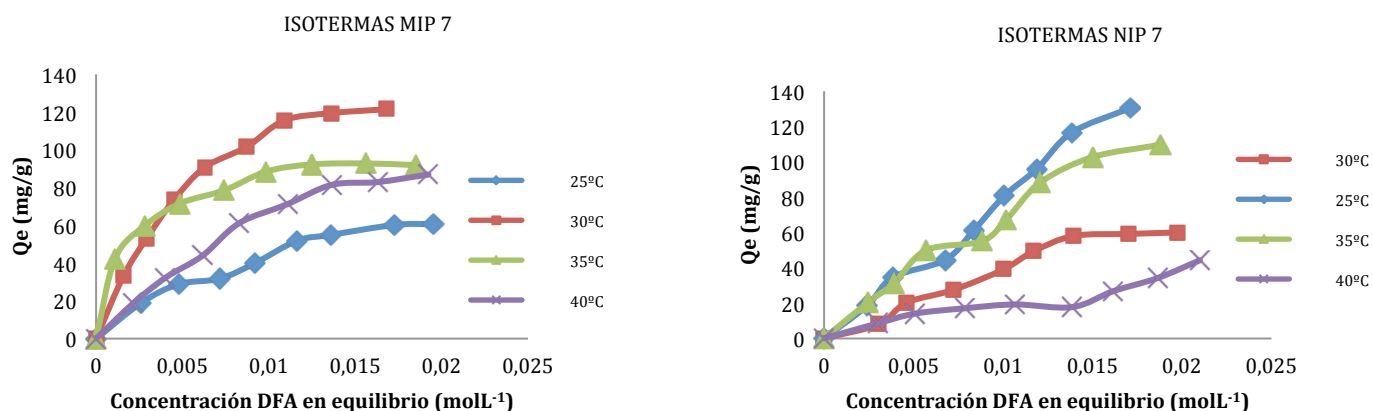


Figura N°59. Isotermas de Adsorción para MIP y NIP 7 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.

Al evaluar las isotermas del MIP 7, (ver figura 59) se observa que el perfil que se obtiene a las 4 temperaturas estudiadas corresponde a una adsorción del tipo I, denominada isoterma de Langmuir, que corresponde a una adsorción en monocapa. La cantidad adsorbida aumenta con la concentración de DFA hasta alcanzar un valor límite correspondiente al recubrimiento de la superficie por una monocapa. Las isotermas del NIP 7 presentan una forma distinta a las estudiadas anteriormente: se pueden identificar isotermas de adsorción a 25, 30, 35 y 40°C que corresponden a isotermas del tipo III, en este caso la adsorción de DFA sigue una adsorción física en multicapas, pero la formación de la primera capa no se diferencia de las siguientes en términos de su equilibrio.

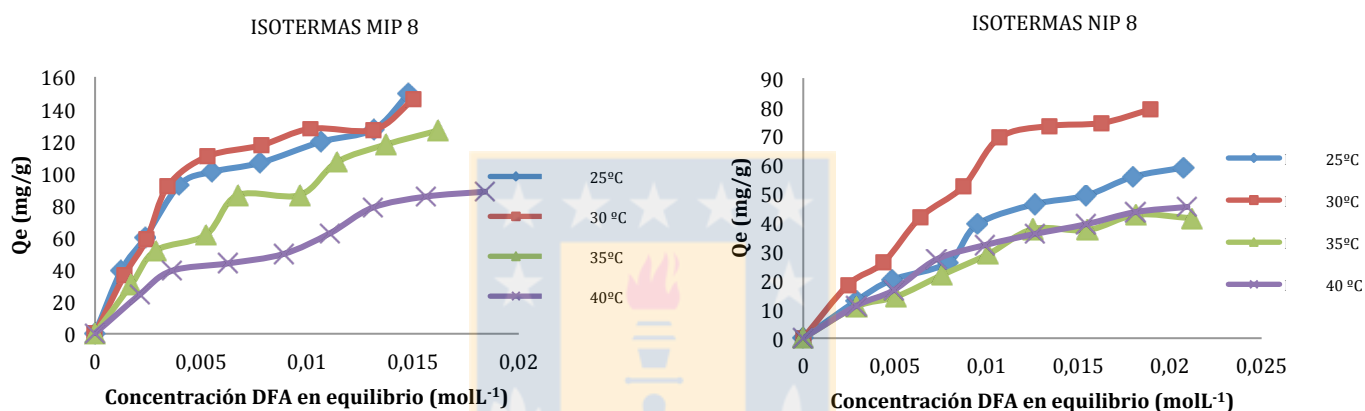


Figura N°60. Isotermas de Adsorción para MIP y NIP 8 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.

En la figura 60 se pueden apreciar las isotermas de adsorción para los MIPs 8 y NIPs 8. Al estudiar los MIPs se puede observar que a 25 y 30°C se obtiene una isoterma del tipo I, en que se obtiene la formación de una monocapa de DFA sobre la superficie del MIP. A 40°C se puede apreciar una isoterma de adsorción que se puede clasificar como tipo II, que corresponde a una adsorción multicapa, donde la primera capa tiene una mayor velocidad de formación y energéticamente es más estable que la segunda. Por último, a 35°C se puede observar una isoterma del tipo VI, que corresponde a una adsorción que se da el multicapas hasta alcanzar el equilibrio.

Al observar las isotermas que se obtienen para los NIPs 8 se puede apreciar que a 25, 30, 35 y 40°C se obtienen perfiles de adsorción muy similares, los que se pueden clasificar dentro de una isoterma tipo I, pero hay que destacar que la cantidad de analito adsorbido sobre la DFA es muy menor en comparación con el MIP, lo que indica que la formación de la monocapa se obtiene con gran velocidad, debido a que los sitios activos hacia la adsorción de DFA son acotados en los NIPs.

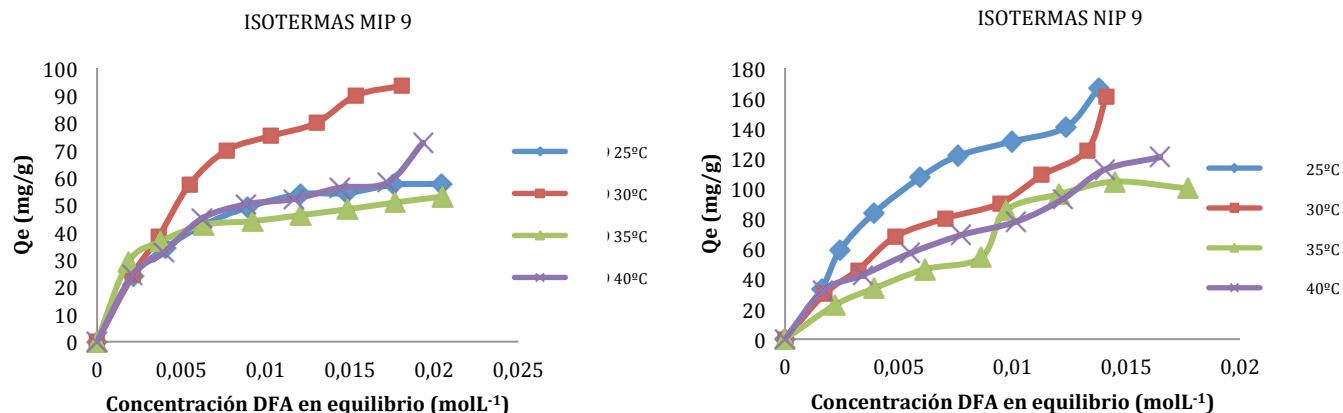


Figura N°61. Isothermas de Adsorción para MIP y NIP 9 a diferentes temperaturas, 25, 30, 35 y 40°C.

Al observar las isothermas de adsorción que se obtienen para los MIPs 9, (ver figura 61) estas se pueden clasificar como isothermas que corresponden a un fenómeno de adsorción del tipo I, es decir a la formación de monocapas en un material poroso que siguen una adsorción física.

Las isothermas de adsorción para los NIPs 9 se pueden clasificar en dos grupos: el primero corresponde a las isothermas a 25, 30 y 40°C. Éstas isothermas se pueden clasificar como isothermas de adsorción del tipo II, que indican una adsorción física en multicapas. El rápido ascenso inicial corresponde a la formación de la primera capa, que tiene una constante de formación mayor que para el resto de las capas. Al seguir aumentando la concentración de DFA se forma la segunda capa de moléculas adsorbidas. La segunda clasificación corresponde a la isoterma obtenida a 35°C que corresponde a una isoterma del tipo IV en que el equilibrio se alcanza en forma de multicapas adsorbidas físicamente.

Cabe mencionar que este tipo de clasificación es utilizado para simplificar la denominación de las isothermas y una clasificación de BDDT no debe ser utilizada como una única forma de clasificar los fenómenos de adsorción.

3.10.2 Isothermas linealizadas de Freundlich y Langmuir.

Varios modelos matemáticos se pueden utilizar para estudiar los datos experimentales de isothermas de adsorción. Para analizar los datos obtenidos en este trabajo se utilizan los modelos de Langmuir y Freundlich ya que existe evidencia científica que avala el uso de este tipo de estos modelos en MIPs⁷⁴.

La isoterma de Freundlich es una isoterma de adsorción, que relaciona la concentración de un adsorbato en la superficie de un adsorbente, con la concentración del soluto en el líquido con el que está en contacto.

La isoterma de adsorción de Langmuir permite describir cuantitativamente una gran capa de moléculas sobre una superficie adsorbente como una función de la concentración del material adsorbido en el líquido con el que está en contacto.

Ajustando los datos a los modelos de isothermas se puede describir con precisión los resultados experimentales de las isothermas de adsorción y así encontrar el modelo más adecuado para MIPs y NIPs. (Ver anexo 1)

A partir de las isothermas linealizadas de Langmuir y Freundlich se pueden obtener los parámetros de unión a , m , capacidad máxima de adsorción ($Q_{\max}$), y constante de Langmuir (k), entre otros. Con estos parámetros se puede establecer cual resina es la que presenta mayor retención y también el tipo de superficie que presentan las resinas.

Tabla N°18. Parámetros de unión calculados a partir de isothermas linealizadas para MIPs y NIPs 1, 2 y 3.

	MIPs						NIPs					
	Freundlich			Langmuir			Freundlich			Langmuir		
Polímero-Temperatura	a	m	R^2	$Q_{\max}$ (mg/g)	K (L/mg)	R^2	a	m	R^2	$Q_{\max}$ (mg/g)	K (L/mg)	R^2
1 - 25°C	13539	0,895	0,963	2203	0,172	0,987	5885	0,911	0,955	250	0,381	0,927
1 - 30°C	7358	1,085	0,955	1156	0,971	0,976	35326	0,779	0,953	1000	0,357	0,941
1 - 35°C	1345	2,078	0,954	2960	0,0408	0,998	21632	0,813	0,961	500	0,213	0,952
1 - 40°C	1244	1,846	0,964	3033	0,0428	0,967	3597	1,25	0,949	1250	0,444	0,987
2 - 25°C	408	3,108	0,961	2860	0,011	0,953	1523	1,533	0,957	1050	0,167	0,987
2 - 30°C	4373	1,266	0,961	1666	0,353	0,982	66649	0,676	0,965	333	0,233	0,986
2 - 35°C	3969	1,401	0,958	2500	0,16	0,994	3849	1,276	0,955	1260	0,712	0,976
2 - 40°C	21389	0,859	0,960	1025	0,5	0,991	3683	1,148	0,957	1000	1,429	0,980
3 - 25°C	798	1,589	0,951	910	0,079	0,935	1093	1,272	0,968	333	0,566	0,984
3 - 30°C	608	2,743	0,952	2560	0,027	0,998	5767	0,868	0,956	227	0,424	0,978
3 - 35°C	2593	1,284	0,971	1121	0,212	0,980	7054	0,888	0,958	250	0,034	0,953
3 - 40°C	1208	1,456	0,956	1163	0,016	0,978	6495	0,853	0,952	210	0,270	0,955

En la tabla 18 se presentan los parámetros obtenidos a partir de la linearización de las correspondientes isothermas de adsorción. Al evaluar el coeficiente de regresión lineal para el MIP 1 se obtiene un $R^2 \geq 0,954$ para Freundlich y un $R^2 \geq 0,967$ para Langmuir, lo que indica que los MIPs correspondientes al sistema 1 se ajustan de mejor forma a la isoterma de Langmuir. Esta tendencia se repite en todos los experimentos del sistema 1 tanto para MIPs como para NIPs. Es decir, la isoterma linealizada de

Langmuir explica de mejor forma el fenómeno de adsorción que está ocurriendo. En otras palabras, se está en presencia de una adsorción física en monocapas, que puede ser seguida por la formación de una segunda capa o más (isotermas del tipo II).

En cuanto al parámetro m obtenido de la isoterma de Freundlich indica una superficie fundamentalmente homogénea ($m > 1$) y también se observa que la homogeneidad es mayor para MIPs que para NIPs.

En cuanto a los parámetros de Langmuir el más relevante es la capacidad máxima de carga (Q_{max}), lo que da una estimación de la capacidad que las resinas presentan para retener los analitos en cuestión. Al evaluar los MIPs y NIPs 1, 2 y 3 se puede apreciar que hay un mayor Q_{max} en todos los MIPs: la capacidad máxima de carga es mucho mayor para MIPs que para NIPs.

Para los MIPs y NIPs número 1 a distintas temperaturas se puede apreciar que la mayor capacidad de retención de DFA está en el MIP 1 a 35 y 40°C con 2960 y 3033 mg de DFA respectivamente retenida por gramo de MIP. Los NIPs a estas temperaturas presentan capacidades máximas de carga de 500 y 1250 mg de DFA por gramo de NIP.

Para el MIP 2 la máxima capacidad de carga se encuentra a 25°C con un Q_{max} cercano a los 2900 mg de DFA por gramo de MIP. A esta misma temperatura se observa que el Q_{max} para el NIP es 1050 mg de DFA por gramo de NIP, lo que refleja una diferencia en sus capacidades máximas de carga del orden de 2,8 veces más DFA en el MIP que en el NIP.

Al observar los parámetros de unión, en especial el Q_{max} para MIP y NIP 3 a las cuatro temperaturas, se puede apreciar que la máxima capacidad de carga para el MIP 3 se encuentra a 30°C, con una capacidad de carga de 2560 mg de DFA por gramo de MIP. La máxima capacidad de carga del NIP a esta temperatura es 227 mg de DFA por gramo de NIP, lo que refleja una diferencia de Q_{max} del orden de 11,3 veces. Este resultado muestra una gran diferencia en cuanto a las máximas capacidades que los polímeros presentan para retener DFA. Hecho que da indicios de la capacidad de utilizar este MIP como extractor en fase sólida para preconcentrar DFA.

Nuevamente se puede apreciar que a mayor cantidad de entrecruzador, la retención de DFA es mayor y el Q_{max} también. En general el MIP 1 es el que presenta las mayores capacidades máximas de carga; este MIP se compone de un 300 mol% de entrecruzador. El MIP 2 es el segundo con mayor capacidad máxima de carga, y también es el segundo MIP en cuanto a la concentración de entrecruzador, que es de 175 mol%. Por último el MIP 3 es el MIP que presenta el menor Q_{max} , lo que es

consecuente con lo planteado, ya que también es el MIP que menor % de entrecruzador tiene en su síntesis con tan solo un 50 mol%.

Tabla N°19. Parámetros de unión calculados a partir de isotermas linealizadas para MIPs y NIPs 5, 6 y 7.

	MIPs						NIPs					
	Freundlich			Langmuir			Freundlich			Langmuir		
Pólímero-Temperatura	a	m	R ²	Q _{max} (mg/g)	K (L/mg)	R ²	a	m	R ²	Q _{max} (mg/g)	K (L/mg)	R ²
4 - 25°C	482	2,552	0,976	2541	0,034	0,961	2345	1,140	0,971	277	0,380	0,890
4 - 30°C	3853	1,370	0,952	1851	0,246	0,991	6136	1,054	0,957	555	1,287	0,971
4 - 35°C	2804	0,841	0,950	576	0,287	0,950	9747	0,915	0,925	500	0,267	0,961
4 - 40°C	803	2,114	0,951	2457	0,0427	0,943	2535	1,233	0,947	417	1,498	0,956
5 - 25°C	2447	0,817	0,954	454	0,3797	0,955	1278	1,195	0,962	322	1,035	0,983
5 - 30°C	1272	2,051	0,954	2854	0,0481	0,987	3152	1,095	0,938	416	0,801	0,931
5 - 35°C	1509	1,637	0,962	2222	0,0714	0,961	4478	0,993	0,969	312	0,697	0,975
5 - 40°C	7042	0,992	0,978	769	0,0928	0,983	2288	1,183	0,984	344	0,632	0,989
6 - 25°C	873	1,585	0,961	1041	0,0341	0,932	2162	1,364	0,957	1206	0,176	0,987
6 - 30°C	180	3,069	0,974	1694	0,0324	0,970	3588	1,168	0,961	526	0,761	0,979
6 - 35°C	1995	1,276	0,972	833	0,3646	0,984	10418	0,955	0,972	571	1,946	0,972
6 - 40°C	1818	1,298	0,980	625	0,3568	0,985	12356	0,922	0,968	337	0,780	0,979

Al evaluar las isotermas de MIPs y NIPs 4, 5 y 6 (ver tabla N°19) se puede observar que los coeficientes de correlación (R^2) son relativamente mejor para la isoterma de Langmuir en comparación con la isoterma de Freundlich, lo que indica que nuevamente los datos obtenidos se ajustan mejor al modelo de Langmuir. Debido a este hecho se espera una adsorción del analito en el adsorbente en forma de una monocapa, lo que puede estar seguido de la formación de una segunda o más capas.

El parámetro m obtenido a partir de la isoterma de Freundlich indica presencia de superficies homogéneas ($m > 1$), con valores que son muy similares entre MIPs y NIPs. Sin embargo esta tendencia no se da en todo el set de experimentos ya que se puede observar que en el MIP 4 a 35°C, en el MIP 5 a 25°C y a 40°C, en el NIP 4 a 35°C, NIP 5 a 35°C y NIP 6 a 35 y 40°C se obtienen valores de $m < 1$, lo que indica la presencia de una superficie más bien heterogénea.

Al evaluar la capacidad máxima de carga (Q_{max}) para MIP y NIP 4 se puede observar que Q_{max} para los MIP 4 a 25°C y 40°C es cercana a 2500 mg de DFA por gramo de MIP. Comparando estos datos con los blancos respectivos se observa que el Q_{max} para NIPs 4 a 25 y 40°C es 277 y 477 mg de DFA por gramo de NIP respectivamente. Al comparar el MIP 4 con el NIP 4 a 25°C la diferencia de Q_{max} está cercana a 9 veces más retención en el MIP. Al hacer el mismo análisis para el MIP 4 a 40°C se puede observar que la diferencia de Q_{max} es 5,2 veces.

La mayor capacidad máxima de carga para el MIP 5 se encuentra a 30°C, con un Qmax de 2854 mg de DFA por gramo de MIP. El NIP 5 a la misma temperatura presenta un Qmax de 416 mg de DFA por gramo de NIP, lo que indica que el MIP adsorbe 6,86 veces más. Por último el mayor Qmax para MIP 6 se encuentra a 30°C con 1694 mg de DFA retenida por gramo de MIP. Qmax del NIP 6 a esta misma temperatura es 526 mg de DFA retenida por gramos de NIP, siendo al diferencia en la retención de DFA por parte de MIP y NIP del orden de 3,22 veces mayor capacidad de retención de DFA a la misma temperatura.

Tabla N°20. Parámetros de unión calculados a partir de isothermas linealizadas para MIPs y NIPs 7, 8 y 9.

Pólímero- Temperatura	MIPs						NIPs					
	Freundlich			Langmuir			Freundlich			Langmuir		
	a	m	R ²	Qmax (mg/g)	K (L/mg)	R ²	a	m	R ²	Qmax (mg/g)	K (L/mg)	R ²
7 - 25°C	710	1,643	0,976	813	0,108	0,977	7561	1,006	0,979	505	4,950	0,979
7 - 30°C	1380	1,787	0,958	2336	0,087	0,997	4582	0,954	0,938	250	0,579	0,921
7 - 35°C	311	3,512	0,966	1917	0,026	0,981	3243	1,119	0,978	595	0,560	0,988
7 - 40°C	1731	1,381	0,976	653	0,294	0,997	535	1,402	0,877	280	0,180	0,922
8 - 25°C	1168	2,040	0,952	2448	0,051	0,997	1368	1,261	0,977	390	0,377	0,986
8 - 30°C	1436	1,901	0,892	2583	0,090	0,972	1868	1,308	0,962	626	0,307	0,979
8 - 35°C	1514	1,675	0,967	2014	0,087	0,976	852	1,259	0,965	401	0,218	0,967
8 - 40°C	891	1,725	0,957	1259	0,086	0,951	803	1,394	0,969	406	0,259	0,989
9 - 25°C	283	2,575	0,955	1506	0,047	0,998	2980	1,497	0,951	2008	0,177	0,969
9 - 30°C	1184	1,641	0,954	1383	0,118	0,991	2958	1,383	0,973	1676	0,132	0,985
9 - 35°C	132	4,248	0,977	2305	0,016	0,981	2798	1,262	0,950	1003	0,203	0,969
9 - 40°C	382	2,267	0,961	1633	0,047	0,974	1244	1,709	0,977	2014	0,062	0,931

Al evaluar los parámetros de unión para los MIPs y NIPs 7, 8 y 9 (ver tabla 20) se puede observar que el coeficiente de correlación R² indica una mejor linealidad para las isothermas de Langmuir, al igual que en los dos casos anteriores. Es decir, nuevamente nos encontramos con un fenómeno de adsorción en monocapa con la posibilidad de la adsorción de una segunda o más capas.

Al evaluar el parámetro m que se obtiene a partir de la isoterma de Freundlich se observa que para todos los casos m>1 lo que indica presencia de superficies mayormente homogéneas con valores muy similares entre MIPs y NIPs.

Por último el parámetro más importante a la hora de evaluar la capacidad de retener el DFA es la capacidad máxima de carga (Q_{max}), donde se observa que en prácticamente todos los casos se obtiene una capacidad de retención de DFA mucho mayor para MIPs que para NIPs. Para el MIP 7 se observa que el mayor Q_{max} se encuentra a 30°C con 2337 mg de DFA por gramo de MIP. Al evaluar el NIP a la misma temperatura Q_{max} es 250 mg de DFA por gramo de NIP, lo que se traduce a una capacidad de retener DFA del orden de 9,4 veces mayor en el MIP.

El mayor Q_{max} para el MIP 8 también se obtiene a los 30°C y es 2583 mg de DFA por gramo de MIP. Cuando se evalúa el NIP 8 a 30°C éste presenta un Q_{max} de 626 mg de DFA por gramos de NIP y la diferencia que se presenta entre el Q_{max} del MIP y NIP 8 a 30°C es 4,2 veces mayor Q_{max} en el MIP.

Al evaluar lo sucedido con el MIP y NIP 9 se puede apreciar que en estos polímeros Q_{max} de MIPs y NIPs es muy similar en todas las temperaturas, incluso siendo mayor Q_{max} del NIP para 3 de las 4 temperaturas estudiadas, 25, 30 y 40°C. Esto que indica que si bien Q_{max} de los MIPs es elevado, este MIP no es el polímero más adecuado para adsorber selectivamente DFA, ya que el blanco (NIP) adsorbe DFA en una misma proporción, lo que puede indicar que no hay formación de sitios activos para la adsorción de DFA en el MIP, y la adsorción se puede deber solamente a la porosidad tanto de MIPs como de NIPs.

Como se mencionó anteriormente se observa en general para todos los sistemas estudiados que la capacidad máxima de carga (Q_{max}) es mayor para los MIPs que para los NIPs. Con el fin de mostrar más detalladamente esta tendencia se muestran a continuación las representaciones gráficas de la capacidad máxima de adsorción para MIPs y NIPs de un mismo sistema a distintas temperaturas.

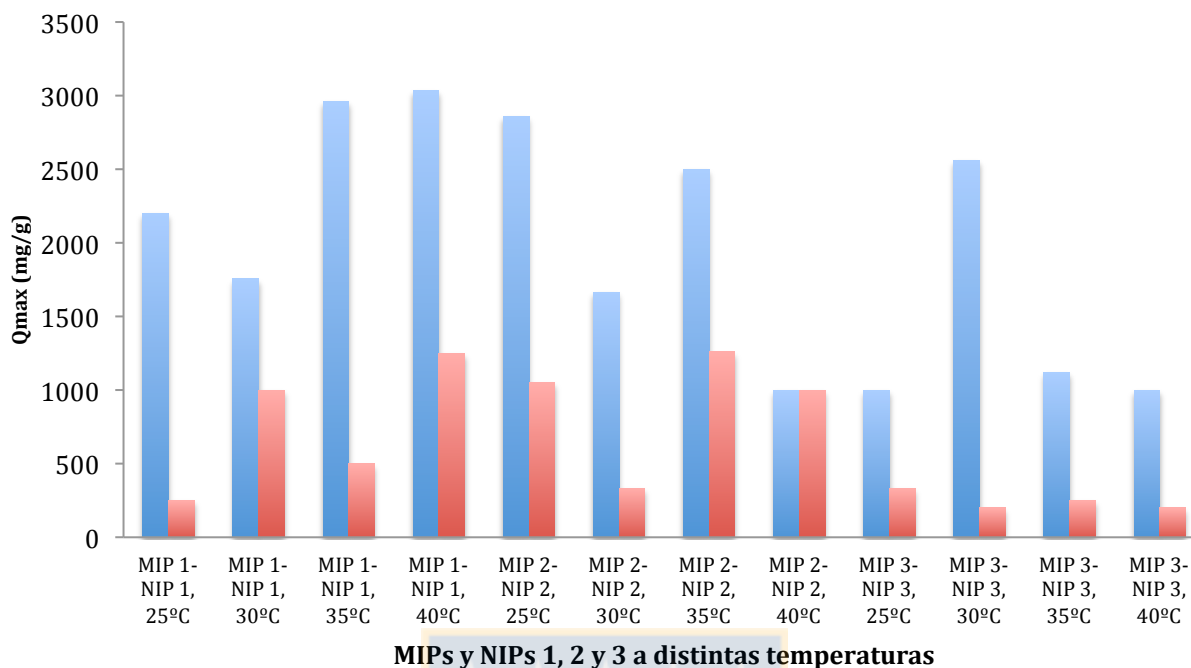


Figura N°62. Capacidad máxima de adsorción de DFA para MIPs y NIPs 1, 2 y 3 a distintas temperaturas.

En la Fig. 61 se pueden observar las capacidades máximas de retención de DFA por parte de los MIPs y NIPs 1, 2 y 3, utilizando VPi como monómero. En primer lugar se observa que todos los MIPs presentan iguales o mayores capacidades de carga que sus blancos (NIPs), resultado que se condice con los estudios de retención y los estudios cinéticos presentados con antelación. Se puede apreciar que no hay una tendencia clara en cuanto a la variación de Q_{max} con respecto a la temperatura en todos los MIP y NIPs 1, 2 y 3. Al evaluar Q_{max} para los polímeros denominados 1 se puede apreciar que la mayor retención se encuentra a 35°C donde se obtiene una diferencia en la máxima capacidad de retención entre MIP y NIP de 5,9 veces.

Para los polímeros MIPs y NIPs 2 se puede apreciar una tendencia en que se ve que a medida que la temperatura aumenta Q_{max} disminuye, comportamiento que se había apreciado en resultados anteriores en nuestro grupo de investigación¹⁰⁷. Por otra parte se puede apreciar que la máxima diferencia entre MIP y NIP es de 2,7 veces y se presenta a 25°C.

Por último al evaluar los MIPs y NIPs 3 se puede observar que no hay tendencia evidente en cuanto a la variación de Q_{max} con respecto a la temperatura. La mayor diferencia de Q_{max} entre MIP y NIP se encuentra cuando la isoterma se realiza a 30°C, que es del orden de 10 veces. Se puede mencionar que para MIP 1 y MIP 3 la mayor diferencia en Q_{max} se presenta a 30°C, lo que puede significar que ésta es la

temperatura óptima del ensayo. Por otra parte existe otra similitud entre el MIP 3 y el MIP 1: ambos polímeros están sintetizados con las mismas cantidades de entrecruzador (300 mol%).

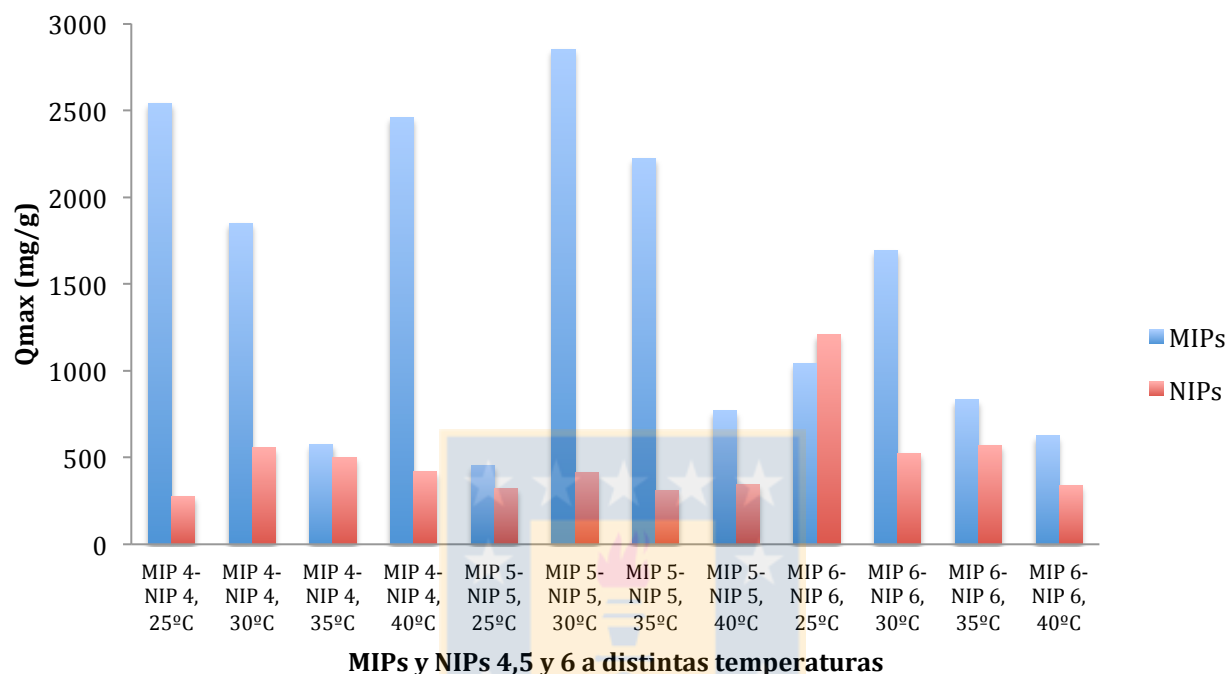


Figura N°63. Capacidad máxima de adsorción de DFA para MIPs y NIPs 4, 5 y 6 a distintas temperaturas.

En la figura 63 se pueden observar los Q_{max} de los MIPs y NIPs 4, 5 y 6 –monómero VIm-. Se puede observar que las capacidades máximas de carga de estos polímeros son similares a las de los MIPs y NIPs 1, 2 y 3.

Los experimentos realizados para los MIPs y NIPs 4 demuestran que no hay una clara tendencia de cómo varía Q_{max} con respecto a la temperatura. Para estos experimentos el mayor Q_{max} se encuentra a dos temperaturas diferentes, a 25 y 40°C donde se aprecia una diferencia entre el Q_{max} de MIP y NIP de 9,2 y 6,1 veces respectivamente. Al analizar la composición del MIP, la cantidad de entrecruzador es (50 mol %), lo que podría indicar que para los MIPs del sistema 2 no hay una tendencia clara entre la cantidad de entrecruzador y la retención de DFA.

Al evaluar los MIPs y NIPs 5 se observa nuevamente que no hay una tendencia evidente en cómo varía Q_{max} con respecto a la temperatura. En este caso el mayor Q_{max} se encuentra a los 30°C –al igual que en el caso del MIP 1 y el MIP 3- aquí la

diferencia entre MIP y NIP es del orden de 6,8 veces. En la composición del MIP 6 la cantidad de entrecruzador aumenta en comparación del MIP anterior, siendo 300 mol %. Es decir, a mayor cantidad de entrecruzador se observa la mayor capacidad de retención de DFA, lo que es consecuente con los resultados obtenidos.

Al observar los resultados que se presentan para los MIPs y NIP 6 se puede observar en primera instancia que su Q_{max} es la menor que se ha observado hasta el momento, hecho que puede deberse a la composición sintética del polímero que tiene cantidades intermedias de todos los componentes de la mezcla: 175 mol % de entrecruzador, 6 mL de solvente, 20 mol % de plantilla y 2 mol % de iniciador. Se puede observar que la mayor capacidad de retención máxima de DFA por los polímeros denominados 6 se encuentra nuevamente a 30°C, observándose una diferencia entre el MIP y en NIP de 3,2 veces.

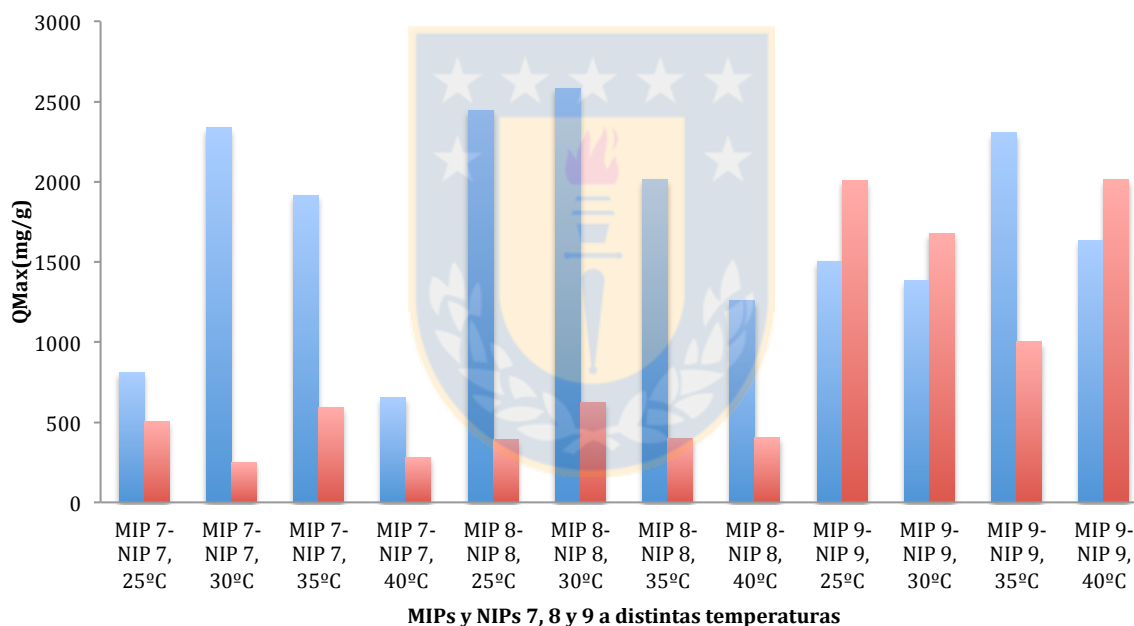


Figura N°64. Capacidad máxima de adsorción de DFA para MIPs y NIPs 7, 8 y 9 a distintas temperaturas.

En la figura 64. Se pueden observar los Q_{max} frente a la temperatura a la que fueron realizadas las isotermas para los MIPs y NIPs 7, 8 y 9, en que el monómero es la acrilamida. Lo primero que se observa es que en este sistema de síntesis se encuentran resultados dispares en cuanto a Q_{max} .

Al evaluar los polímeros MIPs y NIPs 7 se puede apreciar nuevamente que no hay una clara tendencia en cuanto al Q_{max} con respecto a la temperatura. Por otra parte, se

aprecia que el mayor Q_{max} se encuentra en el experimento realizado a 30°C, donde la diferencia entre el Q_{max} para MIP y NIP es del orden de 9 veces. Esto demuestra una gran diferencia en las capacidades de retener DFA por parte de los MIPs en comparación con los NIPs, diferencia que solo puede ser explicada debido a la formación de cavidades durante el proceso de síntesis que presentan propiedades de adsorción hacia la DFA. El MIP 7 presenta la mínima cantidad de entrecruzador (50 mol % del monómero), lo que podría explicar el Q_{max} obtenido, que es relativamente menor que el del MIP 8: al tener menos entrecruzador los grupos, funcionales en las cavidades pueden estar menos rígidos, lo que puede involucrar que las cavidades no estén disponibles para adsorber DFA.

Al evaluar los MIPs y NIPs 8 se observa que la capacidad máxima de carga es similar a 25 y 30°C, lo que es la tendencia que se repite durante el análisis. En este set de experimentos el mayor Q_{max} se encuentra en el experimento realizado a 30°C, y la mayor diferencia de Q_{max} para MIPs y NIPs se obtiene a 25°C con una diferencia entre MIP y NIP del orden de 6,3 veces. La composición de la mezcla de síntesis indica que este MIP presenta la máxima cantidad de entrecruzador, con un 300 mol % de monómero, lo que se traduce en un MIP más altamente entrecruzado, donde los grupos funcionales de las cavidades donde se lleva a cabo la adsorción están fijos, lo que se refleja en una mayor capacidad de retención de DFA.

Por último y como se menciona previamente en los MIPs y NIPs 9 se encuentra un resultado dispar en el que se observa que la capacidad de adsorción de DFA por parte de los MIPs 9 es baja. En 3 temperaturas distintas (25, 30 y 40°C) el material de control (NIP) presenta una mayor retención que el MIP. Esto se puede deber a un error experimental o puede ser debido a una suma de factores, que pueden abarcar desde que las posibles interacciones no enlazantes que se pueden dar entre la acrilamida y la DFA no sean las más efectivas, a lo que se le puede sumar la composición sintética del MIP 9, que está sintetizado con los puntos intermedios de la mezcla de reacción: 175 mol % de entrecruzador, 20 mol % de plantilla, 2 mol % de iniciador y 6 mL de solvente. Como los MIPs y NIPs presentan un elevado Q_{max} , pero similar entre ellos, la formación de cavidades que presenten adsorción hacia la DFA no esta clara. En estos polímeros en particular la retención de DFA debe llevarse a cabo solamente debido a la porosidad de los mismos, por lo que no presentan buenas características para ser utilizados como extractores en fase sólida para la DFA.

3.11. Síntesis y caracterización de nanoMIPs

La síntesis de todas las nanopartículas se llevó a cabo utilizando el método de síntesis en fase sólida. Para ello se inmovilizó la melamina en las esferas de vidrio previamente modificadas con grupos amino a través de glutaraldehído (GA). La biotina se inmovilizó en las esferas de vidrios previamente modificadas con grupos amino, a través del grupo carboxílico de la biotina mediante el agente enlazante EDC/NHS. La composición de la mezcla de polimerización fue adaptada de Hoshino y col¹⁰⁸. Consecutivamente, como se explicó en el procedimiento experimental, se realizó la síntesis de nanoMIPs para melamina en 2 medios, acuoso y orgánico, variando el método de síntesis dependiendo del medio en que se sintetizó. A su vez con los nanoMIPs obtenidos para melamina en medio orgánico se realizó una post-derivatización con PEG, es decir, se recubrieron las nanopartículas con PEG. Se puede mencionar que en general las interacciones entre los nanoMIPs sintetizados y las moléculas plantilla para los cuales fueron diseñados son una combinación de interacciones electroestáticas e hidrofóbicas.

3.12. Preparación de las esferas de vidrio derivatizadas para melamina y biotina

Las esferas de vidrio son utilizadas como una fase sólida debido a su fácil manipulación y su bajo costo. La modificación superficial se puede llevar a cabo con relativa facilidad utilizando una base silanizada^{109, 110}. El procedimiento de inmovilización fue adoptado por Piletsky y col¹¹¹. Este protocolo es claro y está probado para inmovilizar anticuerpos, proteínas u otros compuestos que presenten en su estructura una amina primaria como la melamina¹¹²⁻¹¹⁴. La activación de las esferas de vidrio se llevó a cabo mediante reflujo en NaOH 1molL⁻¹, para incrementar la cantidad de grupos reactivos silanoles (-Si-OH) en la superficie de las esferas de vidrio¹¹⁵, posteriormente se hace reaccionar con APTMS como agente espaciador que además tiene grupos amino primarios superficiales necesarios para continuar con la ruta de síntesis. El siguiente paso fue agregar el (GA) que sirve como espaciador y como agente de enlace entre 2 grupos amino primarios (uno presente en las esferas de vidrio con APTMS y el otro amino presente en la melamina) a través de la formación de una base de Schiff. (ver figura 7a)

Cabe destacar que el APTMS y el GA tienen la tarea de ser un espaciador entre las esferas de vidrio y la molécula plantilla, esto para que cuando se lleve a cabo la polimerización no haya un impedimento estérico al entre la mezcla de reacción y la molécula plantilla¹¹⁶.

El protocolo para la obtención de las esferas de vidrio derivatizadas con biotina es muy similar al procedimiento anteriormente expuesto y queda reflejado en la figura 7b.

Cabe destacar que en esta síntesis el APTMS funciona, al igual que en el procedimiento anterior como un agente espaciador entre la molécula plantilla y las esferas de vidrio, con el fin de minimizar el impedimento estérico durante la síntesis. Por otra parte es destacable que en este caso se utiliza una síntesis ligeramente diferente. En ésta se activa la biotina con el agente EDC/NHS que es uno de los reactivos que más se utiliza en la bioconjugación de moléculas; este agente funciona para crear un grupo amida entre un grupo amino secundario y un grupo carboxílico, es fácilmente disuelto en agua y funciona en un gran número de buffers a distintos pH. De esta forma se enlaza la biotina con las esferas de vidrio modificadas con APTMS.



3.13. Síntesis de nanoMIPs para biotina y melamina en agua, mediante polimerización química.

Para llevar a cabo la polimerización de estas especies en medio acuoso se modificó levemente un protocolo diseñado para sintetizar MIPs en formato de nanopartículas descrito por Hoshino y col. En el que se logró sintetizar nanoMIPs para péptidos.¹⁰⁸ ver figura 65 (la síntesis esta explicada paso a paso en el ítem 3.4.2.2.).

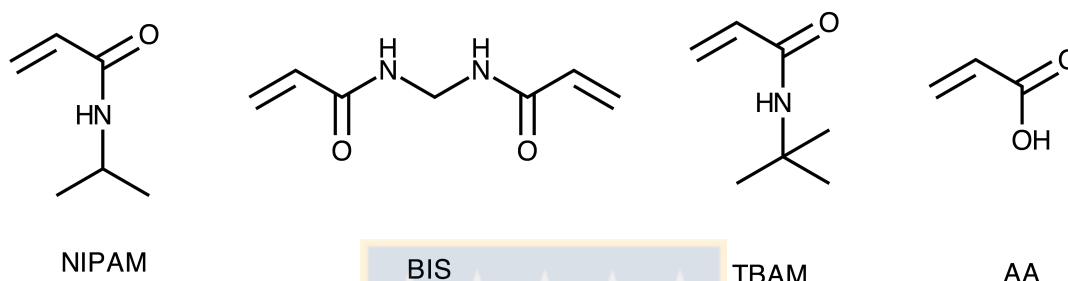


Figura N°65. Monómeros, entrecruzador e iniciador utilizados en la síntesis de nanoMIPs en agua.

Dentro de la mezcla de polimerización el NIPAM tiene un rol importante: es el monómero que se presenta en mayor cantidad y es la columna vertebral de este modelo de síntesis. La BIS es el entrecruzador, el TBAM es un monómero hidrofílico y el AA es un monómero ácido.

El esquema de síntesis descrito en la figura 66 es un resumen del protocolo utilizado para obtener nanoMIPs en agua para melamina o biotina.

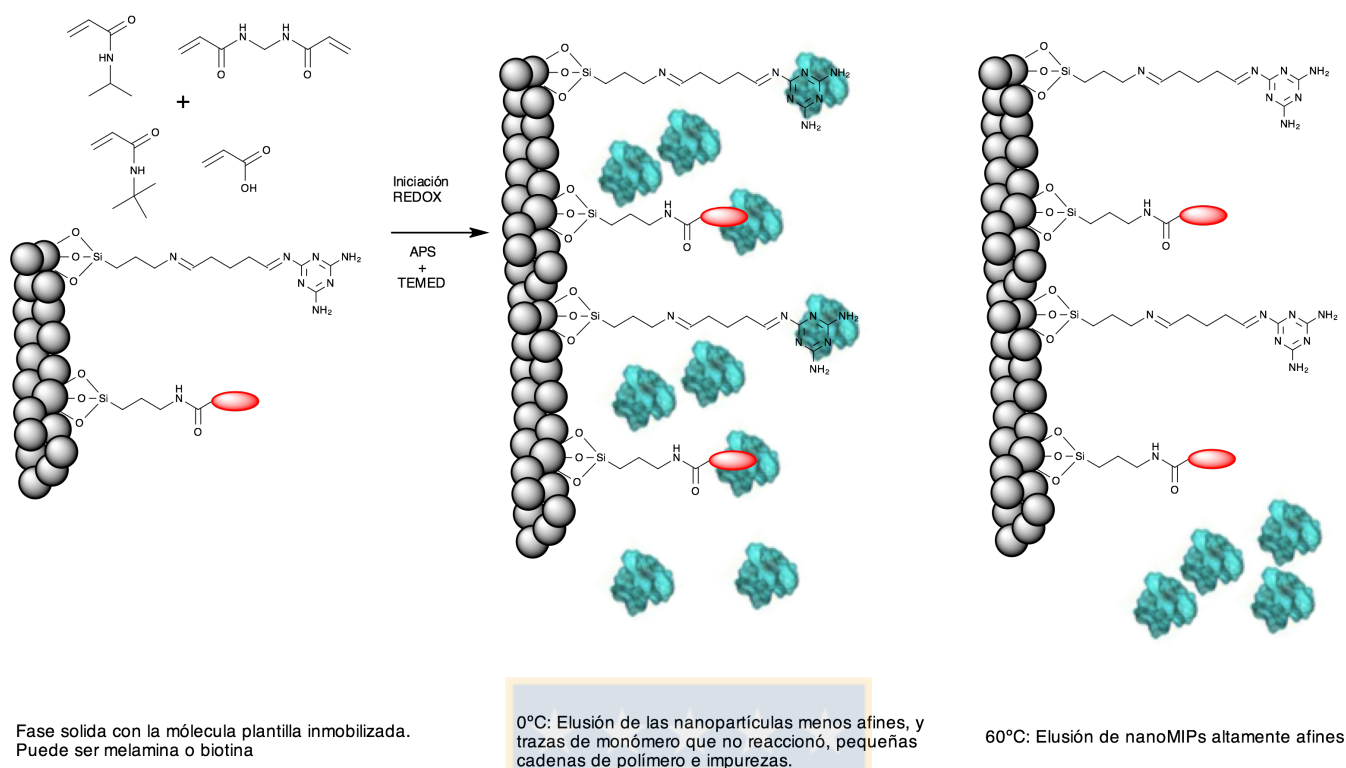


Figura N°66. Esquema de síntesis de nanoMIPs sintetizados en agua, para melamina y biotina

Mediante estudios previos se establecieron las temperaturas óptimas para eluir las nanopartículas no afines y las afines. De esta manera quedó establecido que a 0°C las partículas que son menos afines, las trazas de monómeros que no han reaccionado o simples contaminantes son eluidos y desechados, para así en un paso posterior, incrementando la temperatura del eluyente a 60°C (agua), eluir y coleccionar las nanopartículas más afines con las que se realizaron los experimentos venideros. La concentración de los nanoMIPs obtenidos fue de 0,1035 mg/mL para los nanoMIPs obtenidos a partir de biotina y de 0,0848 mg/mL para los nanoMIPs obtenidos para melamina en agua. Las concentraciones de las nanopartículas se estimaron mediante una curva de calibración (ver anexo 2), en el que se incluyen parámetros de tamaño y absorbancia para así determinar la concentración y un área estimada de sitios de enlace por partícula. Como se mencionó en el procedimiento experimental la concentración óptima para trabajar con los nanoMIPs es 0,056 mg/mL, es decir, en ambos casos hubo que diluir las disoluciones de nanoMIPs hasta obtener la concentración adecuada

El tamaño observado de los nanoMIPs fue medido mediante *Dispersión Dinámica de la luz (DLS)*. En la tabla N°22 se encuentran los resultados obtenidos mediante DLS. Para complementar esta medición se tomaron micrografías mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión, para de ambos tipos de nanopartículas obtenidas, los resultados se encuentran en la figura 67.

Tabla N°21. Absorbancias, tamaños y concentración de nanoMIPs sintetizados en medio acuoso.

MUESTRA	ABSORBANCIA / U. A.	CONCENTRACIÓN / mg mL ⁻¹	DIAMETRO por DLS /nm
nanoMIPs biotina sin sonicar	0,757	0,1035	165,6 +- 6,73
nanoMIPs melamina sin sonicar	0,645	0,0848	142,0 +- 2,925
nanoMIPs biotina sonicados 5 min.	0,790	0,1081	152,3 +- 6,45
nanoMIPs melamina sonicados 5 min.	0,606	0,0823	146,4 +- 5,09
nanoMIPs biotina sonicados 15 min	0,742	0,1015	152,0 +- 4,22
nanoMIPs melamina sonicados 15 min	0,646	0,0879	139,0 +- 5,98
nanoMIPs biotina sonicados 30 min.	0,746	0,1019	140,7 +- 6,91
nanoMIPs melamina sonicados 30 min.	0,625	0,0849	134,3 +- 3,62

Como se puede observar en la tabla precedente las concentraciones de nanoMIPs sintetizados para biotina y melamina son relativamente diferentes. Se obtuvo nanoMIPs relativamente más concentrados para las biotina que para melamina, lo que podría atribuirse al diferente *coupling agent* utilizado, y el distinto impedimento estérico que se produjo en ambas síntesis; para biotina se utilizó solo APTMS como agente enlazante y para la melamina se utilizó APTMS y GA. Otra de las condiciones de la síntesis que pueden haber provocado esta diferencia en la concentración de las nanopartículas corresponde a las características químicas de la melamina y la biotina como tal: es probable que en el caso de la biotina haya más interacciones no enlazantes con los monómeros que pueden contribuir a obtener una mayor cantidad de nanoMIPs por mL colectado, que en el caso de la melamina, que es una moléculas más pequeña con menos sitios de enlace.

Por otra parte se pueden observar los tamaños medidos por DLS: desta en primer lugar que el tamaño de las nanopartículas para biotina es ligeramente mayor que para

melamina. Esto se puede comprender con el tamaño de ambas moléculas plantilla debido a que la biotina es más grande que la melamina. Otro fenómeno relevante es que el tamaño de los nanoMIPs decrece levemente en función del tiempo de sonicación lo que da muestra de los agregados moleculares que hay en la disolución.

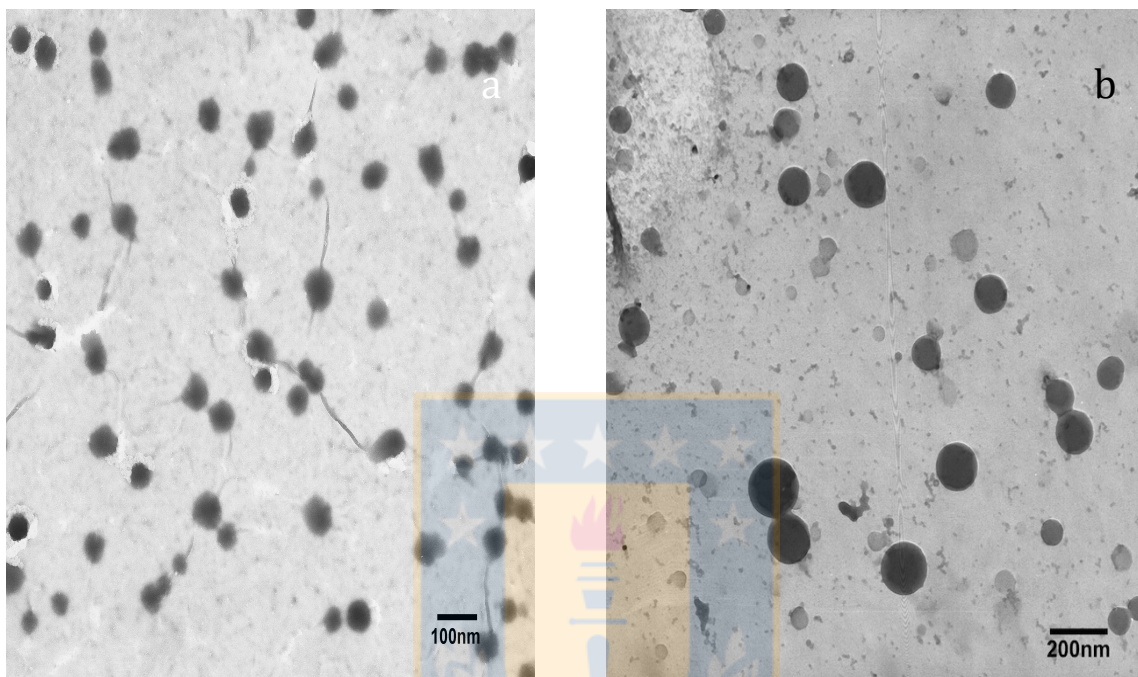


Figura N°67. micrografías TEM para nanoMIPs producidos en optimas condiciones. a) nanoMIPs hechos para biotina. b) nanoMIPs hechos para melamina. Ambos obtenidos en medio acuoso.

Como se puede observar en ambas micrografías hay una dispersión de tamaños normal. La distribución de tamaños esta centrada en el tamaño con más repeticiones, lo que no significa que no pueda haber partículas más pequeñas o más grandes que lo que el DLS muestra; es por esto que una micrografía es útil al momento de evaluar el tamaño de nanopartículas, o cualquier particular en general. Como se puede apreciar en ambos casos se obtienen nanoMIPs esféricos que es lo que se estaba buscando desde un principio. También se observa que para las partículas sintetizadas para melamina hay una tendencia a mantenerse aglomeradas incluso después de sonicar la disolución, probablemente debido a la polaridad de la molécula plantilla (que no es totalmente soluble en agua). Por ende al momento de crearse las cavidades de reconocimiento molecular estas se puede aglomerar entre sí. Después de dejar reposar los nanoMIPs durante 12 horas se vuelven a sonicar 15 min y se miden, obteniéndose prácticamente los mismos resultados.

3.14 Síntesis de nanoMIPs para melamina en acetonitrilo con y sin pegilación, mediante polimerización iniciada fotoquímicamente.

El sistema de síntesis para obtener nanoMIPs hechos para melamina, fue adaptado de Guerreiro et al¹⁰⁴. En la figura 68 se pueden observar las especies químicas involucradas en la síntesis.

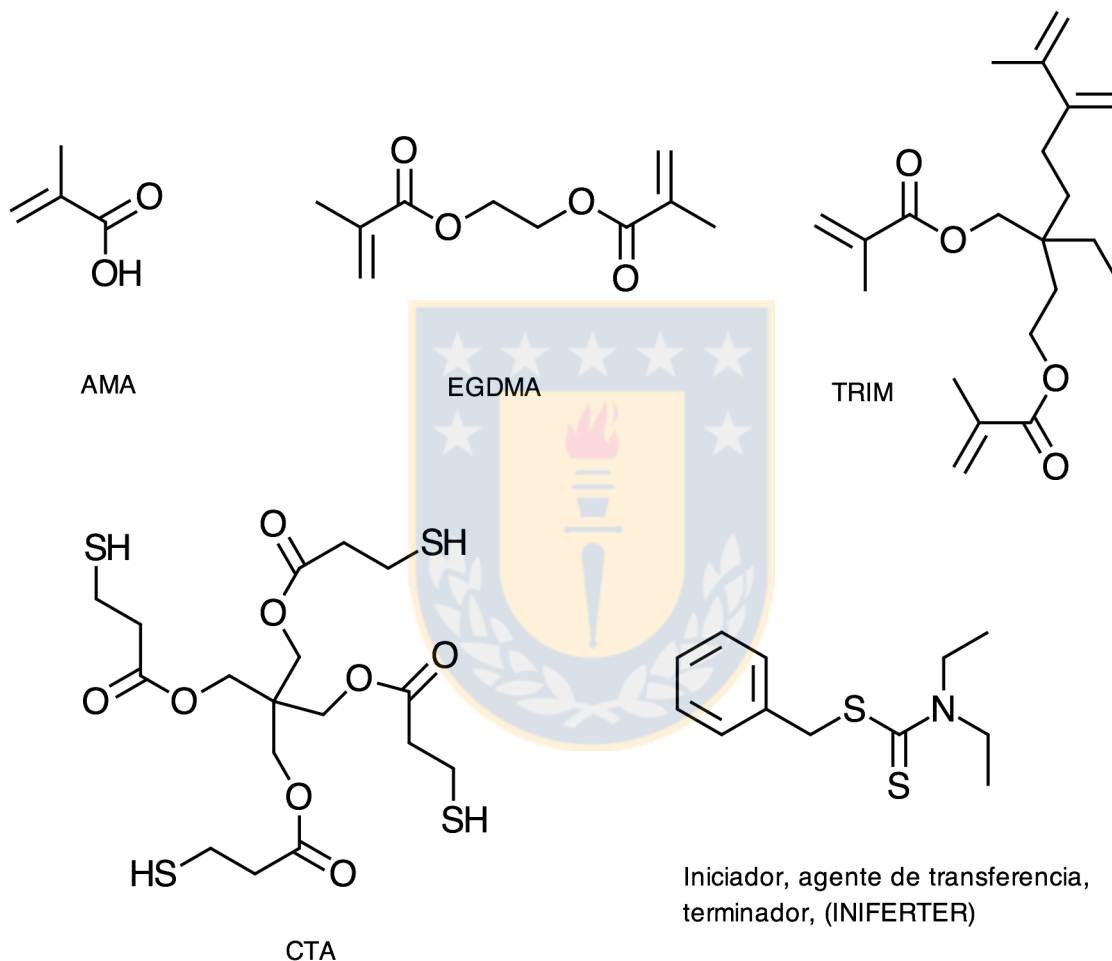


Figura N°68. Monómeros, entrecruzador e iniciador utilizados en la síntesis de nanoMIPs en ACN.

El reconocimiento molecular en este sistema ocurre a través de interacciones no enlazantes, principalmente enlaces de hidrógeno. Estas interacciones no enlazantes se dan entre la molécula plantilla y el monómero funcional AMA. El grupo carboxílico de AMA puede actuar como un aceptor y un donador de enlaces de hidrógeno, lo mismo que la molécula plantilla a partir de sus grupos amino y los nitrógenos del anillo

aromático^{117, 118}. Un esquema de las posibles interacciones puede ser observado en la figura 69.

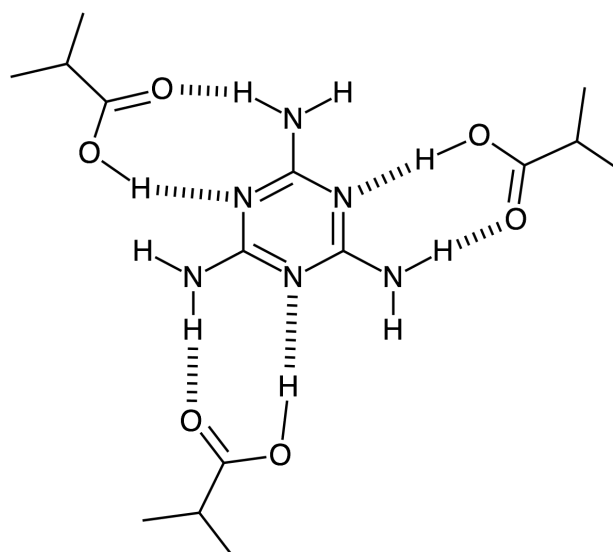


Figura N°69. Esquema de enlaces de hidrógeno entre AMA y melamina.

El protocolo de polimerización basado en una terminación temprana utilizando polimerización radical viva, e iniciado por UV,¹⁰⁴ mantiene una elevada concentración de monómeros funcionales, hecho benéfico para la formación de complejos de pre-polimerización que sean estables^{104, 119}. Por otra parte el corto tiempo de radiación UV al que se somete la mezcla de reacción asegura que la temperatura de la mezcla de reacción permanezca baja durante el proceso de impresión, lo que mejora la afinidad de el material sintetizado^{120, 121}. El bajo tiempo de radiación UV también favorece la síntesis de polímeros con pesos moleculares relativamente bajos, cosa que se requiere para la producción de nanoMIPs. Con el fin de mejorar el proceso de control de la polimerización se ha añadido CTA¹²².

La iniciación fotoquímica basada en polimerización radical viva tiene varias ventajas. El uso de “*iniferters*” permite un mejor control sobre la cinética de reacción, por otra parte evita una alta tasa de polimerización, y el efecto típico de una aceleración de la polimerización radical¹²³. Es de gran importancia la capacidad de iniciar la polimerización en condiciones suaves, esto ocurre al momento de utilizar luz UV para iniciar la reacción. Al momento de cesar la luz UV la reacción cesa, siendo ésta una de las principales características de utilizar la polimerización viva mediante *iniferters*¹⁰⁴.

La mezcla de dos agentes entrecruzantes EGDMA y TRIM se utiliza para proporcionar el correcto equilibrio entre rigidez y flexibilidad, siendo esta relación notablemente importante para asegurar las propiedades de reconocimiento molecular por parte de los nanoMIPs¹⁰⁴. En la figura 70 se puede observar una descripción gráfica de la síntesis.

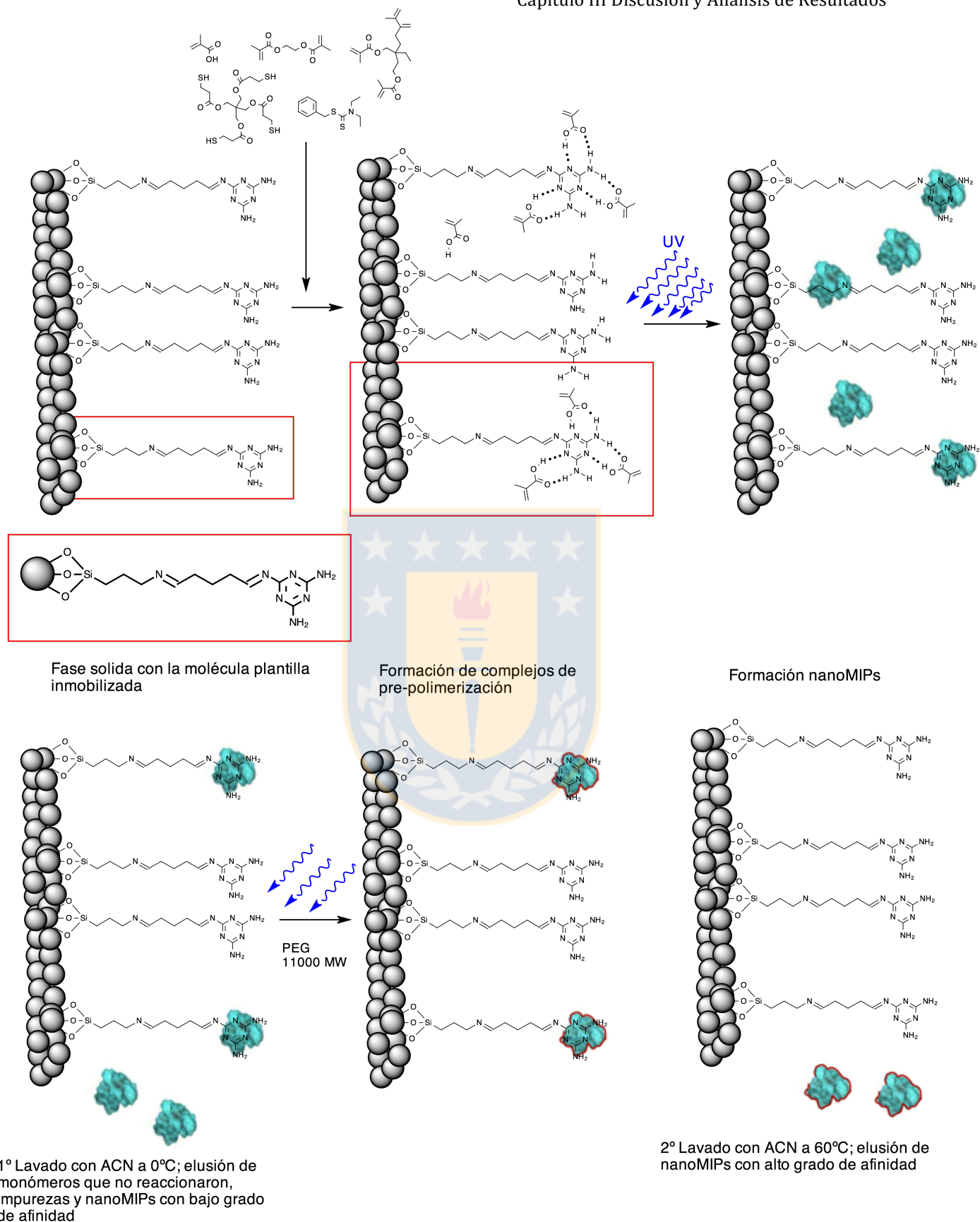


Figura N°70. Esquema de síntesis de nanoMIPs sintetizados en ACN, para melamina.

Mediante estudios previos se establecieron algunos beneficios de utilizar PEG para recubrir nanoMIPs^{105, 124, 125}, como por ejemplo el incremento de la estabilidad de las nanopartículas en suspensión, al igual que la disminución de la agregación de las mismas. Al momento de modificar la superficie de los nanoMIPs con PEG, la energía superficial disminuye, se cambia la polaridad de los nanoMIPs, como resultado la dispersión. El almacenamiento y la estabilidad coloidal de los nanoMIPs con PEG mejora en comparación a los nanoMIPs sin modificación superficial. Lo principal es que no deteriora las propiedades de reconocimiento del material en cuestión.¹²⁴ En el estudio mencionado se evaluaron dos PEG con diferentes pesos moleculares 360 g mol⁻¹ y 1100 g mol⁻¹, llegando a la conclusión de que las características del material mejoraron más con PEG 1100.¹²⁴

La concentración de los nanoMIPs obtenidos para MEL y MEL-PEG fue 0,1082 mg/mL y 0,0976 mg/mL respectivamente. Cabe mencionar que hubo que diluir ambas nanopartículas hasta la concentración adecuada de 0,056 mg/ml.

El diámetro promedio de los nanoMIPs obtenidos por DLS fue 135 +- 4,13 nm para MEL y 152 +- 11 nm para MEL-PEG, como se puede apreciar en la tabla N°22.

Tabla N°22. Absorbancias, tamaños y concentración de nanMIPs sintetizados en medio acuoso.

MUESTRA	ABSORBANCIA / U. A.	CONCENTRACIÓN / mg mL ⁻¹	DIAMETRO promedio por DLS /nm
nanoMIPs MEL sin sónico	0,791	0,1082	139,6 +- 4,13
nanoMIPs MEL-PEG sin sonicar	0,711	0,0971	142,0 +- 2,925
nanoMIPs MEL sonicados 5 min.	0,770	0,1053	132,3 +- 7,32
nanoMIPs MEL-PEG sonicados 5 min.	0,701	0,0956	140,4 +- 3,59
nanoMIPs MEL sonicados 15 min	0,724	0,0988	129,0 +- 9,57
nanoMIPs MEL-PEG sonicados 15 min	0,716	0,0977	139,0 +- 6,08
nanoMIPs MEL sonicados 30 min.	0,717	0,0979	124,7 +- 4,72
nanoMIPs MEL-PEG sonicados 30 min.	0,705	0,0962	134,3 +- 4,22

En este caso se puede apreciar que la diferencia de tamaños entre nanoMIP para MEL y MEL-PEG es muy pequeña, resultado que es coherente ya que finalmente la molécula plantilla es la misma, debido a esto los nanoMIPs son prácticamente los mismos ya que la ruta de síntesis es muy similar. Al evaluar la dispersión de tamaños queda en evidencia que el recubrir las nanopartículas con PEG disminuye la agregación de las mismas, ya que la dispersión de tamaños entre no sonicar y sonicar 5, 10 o 30 minutos permanece prácticamente invariable. Al evaluar este mismo parámetro en los nanoMIPs sin recubrimiento de PEG, se puede observar que la dispersión de tamaños al momento de sonicar con los mismos intervalos de tiempo es notablemente mayor. En la figura. N°71 se pueden observar dos micrografías TEM de los nanoMIPs para MEL sin PEG y con PEG respectivamente.

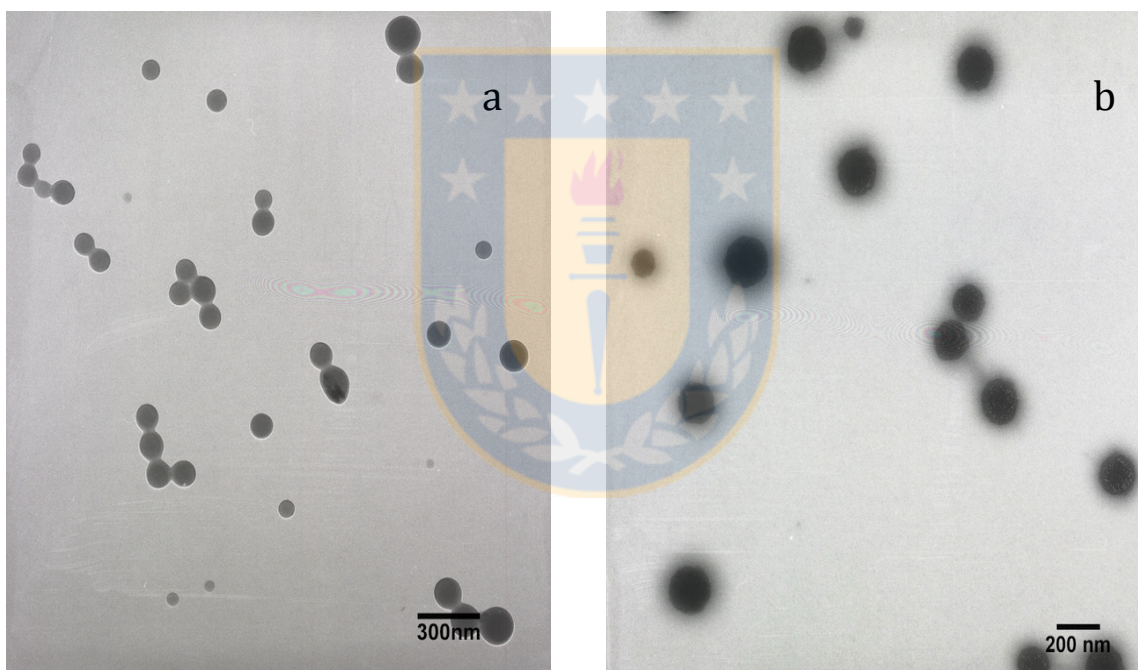


Figura N°71. Micrografías TEM para nanoMIPs obtenidos en optimas condiciones en ACN. a) nanoMIPs para MEL sin PEG. b) nanoMIPs para MEL con PEG.

En ambas micrografías se puede observar que los nanoMIPs obtenidos en ACN son esféricos, por otra parte se observa que la distribución de tamaños es una distribución normal es decir hay una ligera dispersión en el tamaño de las partículas. Por otra parte al observar las micrografías, se puede apreciar que no hay un recubrimiento en la figura 71 a), cosa distinta de lo que se puede observar en la figura 71 b): se puede ver una estela gris clara que rodea a cada nanopartícula por separado, lo que corrobora que el recubrimiento de PEG fue llevado a cabo. Otro punto a destacar es

que se puede apreciar que los nanoMIPs sin PEG están aglomerados y los nanoMIPs con el recubrimiento tienen menos aglomeraciones, es decir su estado de agregación disminuye, lo que corrobora los estudios realizados por Moczko y col.¹²⁴

3.15. Ensayos competitivos de pseudo-ELISA utilizando nanoMIPs.

Después de la síntesis y caracterización, los nanoMIPs fueron utilizados para remplazar anticuerpos en pseudo test de ELISA, con el fin de desarrollar ensayos cuantitativos para dos diferentes analitos, biotina y melamina. La inmovilización de los nanoMIPs está descrita en el apartado 3.4.2.6. Esta inmovilización se llevo a cabo mediante un procedimiento y de una manera similar a la inmovilización de anticuerpos, que frecuentemente son inmovilizados en los microplatos a través de adsorción física.

La inmovilización de los nanoMIPs parece ser eficiente y estable, ya que los nanoMIPs permanecen en los microplatos incluso después de ser lavados en repetidas oportunidades con buffer fosfato. Una vez depositados e inmovilizados los nanoMIPs se procede a utilizarlos en un pseudo test competitivo de ELISA para cuantificar melamina y biotina a través de una competencia entre HRP-B y biotina libre, y entre HRP-M y melamina libre. Estos dos ensayos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de un trabajo previo desarrollado para cuantificar vancomicina.¹⁰³ Estas condiciones incluyeron los mismos pasos de lavado y bloqueo de las paredes de los microplatos, al igual que la concentración de las especies conjugadas HRP-B y HRP-M 2,5 mg mL⁻¹. (Ver Fig. 8 y 9). Las condiciones de análisis de este test están explicadas en el punto 2.3.2.8. del capítulo II.

Para corroborar la especificidad de los nanoMIPs sintetizados se realizó un ensayo en que se inmovilizaron los respectivos nanoMIPs 50 µL (0,056 mg mL⁻¹), para luego mezclarlas durante una hora con una solución de HRP-M o HRP-B 100 µL (de la disolución diluida 1:800 veces a partir de la concentración original de HRP-B y HRP-M) según sea el caso. Transcurrido el tiempo 100 µL del agente revelador de la reacción (TMB) fueron añadidos e incubados durante 10 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo se añadió 100 µL de H₂SO₄ (0,5 molL⁻¹) para detener la reacción enzimática. Posteriormente se midió la absorbancia de cada microplato a 450 nm en un lector de microplatos. Los resultados se muestran en la fig N°72.

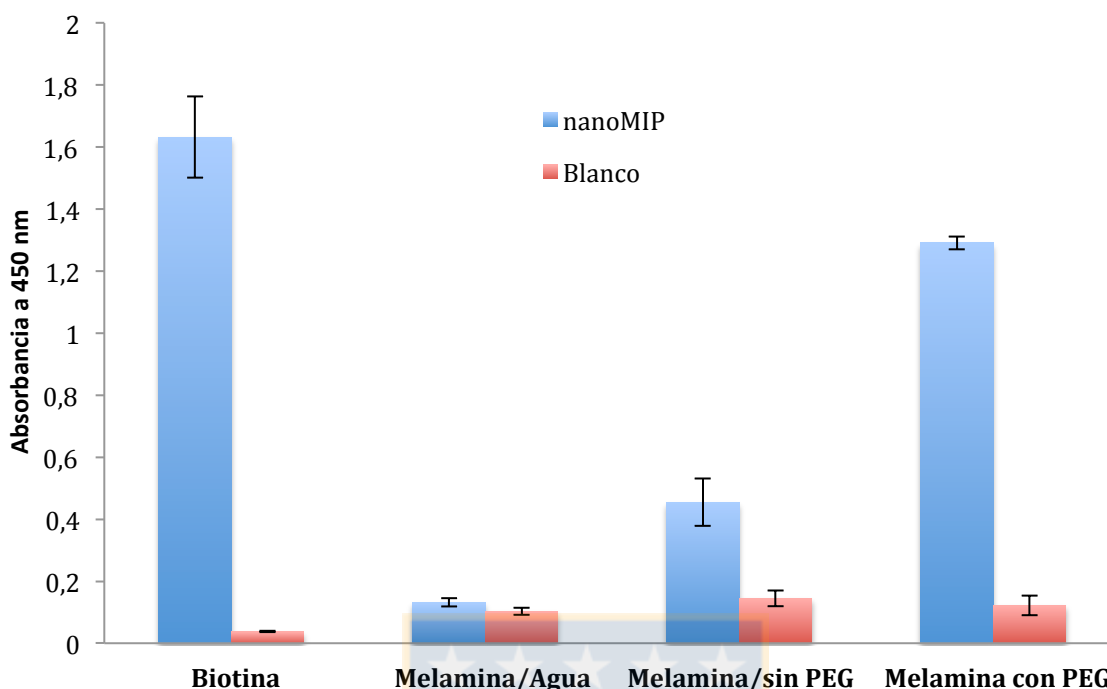


Figura N°72. Capacidad de adsorción de HRP-B y HRP-M por los nanoMIPs respectivos, los blancos son los microplatos sin nanoMIPs, pero con el procedimiento de bloqueo y lavado (descrito previamente). Las barras de error representan la desviación estándar de cada experimento realizado en triplicado

En la figura 72 se observa la capacidad de enlace que presentan los nanoMIPs. Se aprecia que hay diferencias notorias entre los nanoMIPs para biotina y los nanoMIPs para melamina ya sea en medio orgánico u acuoso. Se puede observar que hay una cuantiosa diferencia en términos de absorbancia para el caso de las nanopartículas sintetizadas para biotina con respecto a los blancos. Por otra parte los nanoMIPs sintetizados para melamina en agua mediante polimerización química no muestran especificidad alguna hacia HRP-M. Sin embargo los nanoMIPs sintetizados para melamina en solvente orgánico mediante polimerización UV con y sin PEG muestran afinidad hacia el correspondiente conjugado de HRP-M.

El siguiente experimento es el ensayo competitivo entre el analito libre (biotina o melamina) y el analito conjugado con HRP (HRP-B o HRP-M), para evaluar la respuesta de los nanoMIPs sintetizados a distintas concentraciones de los analitos para los que fueron respectivamente sintetizados.

En el pseudo test competitivo de ELISA para biotina la concentración de biotina libre fue variada entre $0,0001 \text{ nmolL}^{-1}$ – $0,025 \text{ nmolL}^{-1}$ y fue añadida a los microplatos del test de de ELISA al mismo tiempo que la especie conjugada HRP-B ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, 1:800 veces de la solución madre). Los resultados son expuestos en la figura 73 donde claramente se observa que la biotina puede ser detectada en más de tres órdenes de magnitud de concentración. La respuesta de este ensayo sigue una línea recta ($R^2 = 0,9846$) con respecto a la concentración del analito en escala logarítmica en el rango de $0,0001$ hasta $0,025 \text{ nmolL}^{-1}$. El límite de detección de este ensayo es de $7,4 \text{ pmolL}^{-1}$ y fue calculado a partir de 3 veces el valor de la desviación estándar del control (en ausencia de biotina). A concentraciones mayores el ensayo competitivo pierde linealidad y muestra saturación.

Por otra parte a fin de probar la selectividad de los nanoMIPs sintetizados para biotina se procedió a realizar el mismo experimento pero la diferencia es que los nanoMIPs inmovilizados en los microplatos son nanoMIPs sintetizados para melamina (figura 73). El gráfico muestra que HRP-B y la biotina libre no compiten por enlazarse con nanoMIPs específicos para melamina. Como se puede ver la curva no presenta una pendiente notoria y no sigue una tendencia lineal ($R^2 = 0,5463$), lo que demuestra que no hay una interacción entre el analito libre y conjugado con los nanoMIPs para melamina.

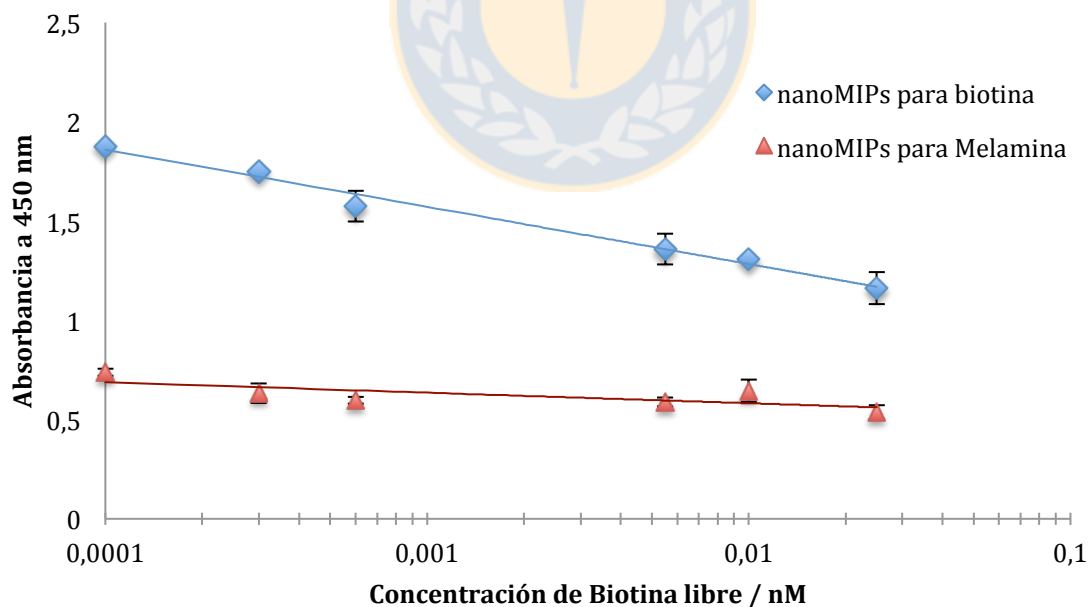


Figura N°73. Ensayo competitivo de Pseudo-ELISA para biotina, llevado a cabo con nanoMIP específicos para biotina y nanoMIPs específicos para melamina para evaluar la selectividad. Las barras de error representan la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.

En los siguientes experimentos se evaluó la capacidad de los nanoMIPs para melamina sintetizados en agua para adsorber el analito para el que fueron sintetizados. Como se apreció en la fig N°72 no se pudo observar ningún rastro de enlaces específicos entre la HRP-M y los nanoMIPs para melamina sintetizados en agua. Para corroborar esto se realizó una prueba competitiva muy similar al experimento mostrado anteriormente en que se varia la concentración libre de analito en este caso melamina entre 10-6000 nmolL⁻¹ y se agrega una concentración conocida de HRP-M (2,5 µg mL⁻¹, 1:800 veces de la solución madre) para revelar un color en el test de ELISA. Los resultados son expuestos en la figura 74. Se puede observar que no hay una respuesta lineal entre la absorbancia y la concentración de melamina ya sea para el blanco o para los nanoMIPs específicos para melamina. Por ende, el material sintetizado no cumple con el objetivo para el que fue diseñado que es reconocer melamina en el test de ELISA. Éste no es un resultado sorpresivo debido a que la melamina es una molécula pequeña y no puede formar enlaces de hidrógenos estables y fuertes con los monómeros en agua, debido a la competencia que va a tener con la misma agua.

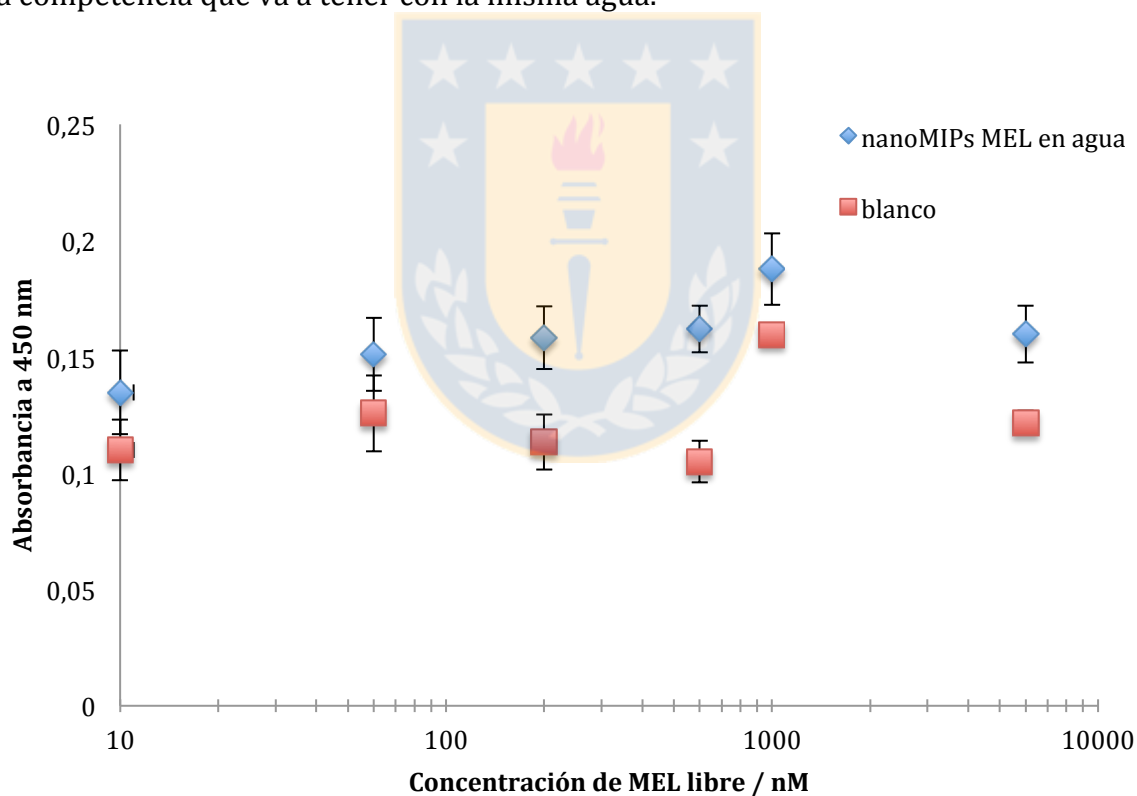


Figura N°74. Ensayo competitivo de Pseudo-ELISA para melamina. Las barras de error representan la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.

Por otra parte los nanoMIPs impresos para melamina a través de polimerización UV en medio orgánico tampoco mostraron un gran desempeño en su capacidad de retención de melamina en el test de ELISA (ver figura N°72). Debido al hecho de que estas nanopartículas no se depositan correctamente en la superficie de los microplatos de utilizados en este ensayo, debido a su hidrofobicidad. Es por este hecho es que se produjeron nanoMIPs con un recubrimiento de PEG, el que debe incrementar la hidrofiliidad superficial de las nanopartículas y por otra parte ofrecer cierta protección hacia los sitios activos del polímero.^{124, 125}

Como se mencionó anteriormente se prepararon nanoMIPs recubiertos con PEG en acetonitrilo vía UV y eluidos con ACN, y posteriormente se les cambio el solvente a agua. El ensayo competitivo de pseudo ELISA se llevó a cabo con concentraciones de melamina libre que van desde 10 a 6000 nmolL⁻¹, donde a su vez se añadió el analito conjugado con la enzima reveladora del color en el test de ELISA (HRP-M), los resultados se muestran en la figura N°75, y se observa una significativa mejora en el ensayo en sí: para estos nanoMIPs el ensayo competitivo muestra buenos resultados en 3 órdenes de magnitud mostrando un rango lineal que va desde 10 nmolL⁻¹ a 6000 nmolL⁻¹ en escala logarítmica, y un límite de detección de 25 nmolL⁻¹. El ensayo competitivo del test de ELISA comienza a mostrar saturación en concentraciones de analito libre sobre 6000 nmolL⁻¹.

Como se puede observar cuando los nanoMIPs están recubiertos de PEG hay una evidencia de un mejor ensayo competitivo entre el analito libre y su especie conjugada HRP-M. Dentro de este mismo experimento se puede observar que no hay similitud con los resultados cuando no se utiliza PEG para recubrir los nanoMIPs.

Estos resultados muestran que nanoMIPs modificados con un recubrimiento de PEG a través de polimerización UV permite la obtención de nanoMIPs monodispersos con una buena afinidad por moléculas pequeñas en ambiente acuoso, y un buen desempeño en pseudo ELISA.

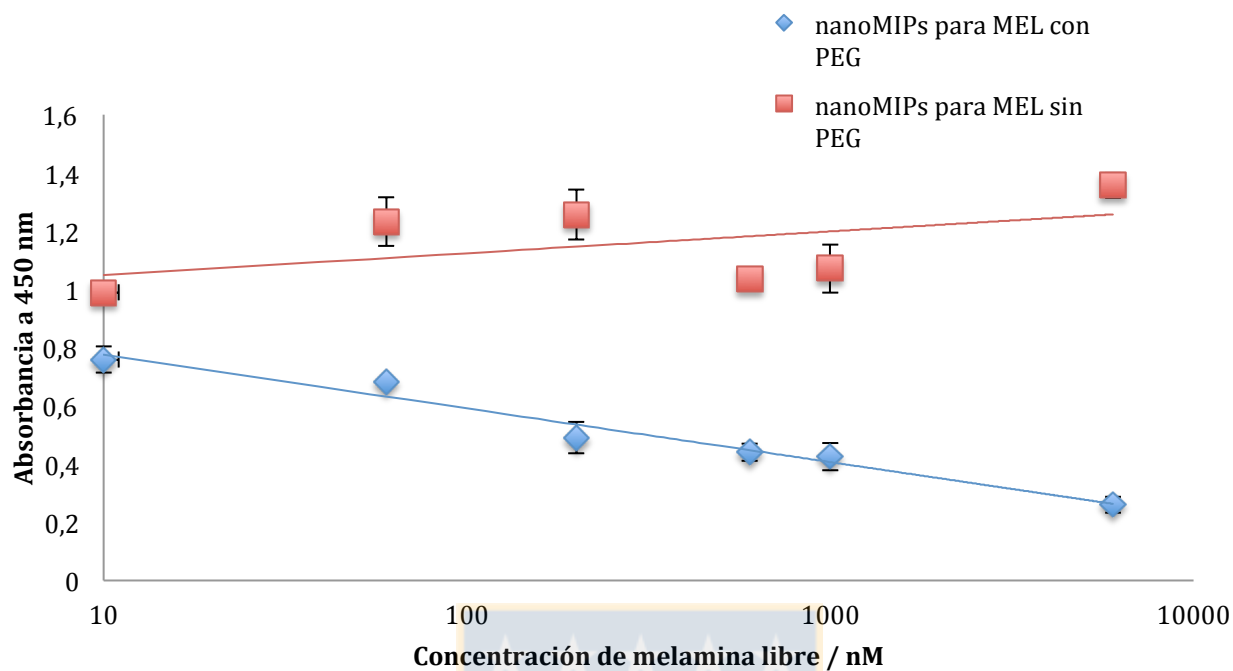


Figura Nº75. Curva de calibración obtenida mediante pseudo test de ELISA para melamina, llevada a cabo con nanoMIPs específicos para melamina con y sin recubrimiento de PEG. Barras de error representan ± 1 la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado.

Se puede mencionar que los polímeros impresos molecularmente son una alternativa a tener en cuenta cuando se desea obtener un material que presente propiedades de adsorción selectiva a distintos analitos. El costo de la fabricación de estos materiales es bajo en comparación con sus pares biológicos (anticuerpos o enzimas) y presentan una mucho mejor estabilidad física y química. En resumen los polímeros impresos molecularmente, presentan las capacidades de adsorción selectiva de las moléculas biológicas, y la estabilidad física y química de los polímeros sintéticos.

CAPITULO IV

Conclusiones

- Se han sintetizado polímeros impresos molecularmente (MIPs) en dos formatos; como micro y nano partículas, se ha estudiado la capacidad que estos presentan para adsorber distintos analitos (DFA, Melamina y Biotina) mediante metodología BATCH y mediante un test de inmunoensayo como el test de ELISA. Por otra parte se estudió el efecto de la derivatización de los nanoMIPs con PEG.
- Mediante el método de polimerización radicalaria en solución se lograron sintetizar partículas de polímeros impresos molecularmente en tamaño micrométrico. Es destacable el alto porcentaje de rendimiento, muy superior al 60 % para los tres sistemas de síntesis evaluados. Por otra parte la reproducibilidad de las síntesis es elevada alcanzándose un coeficiente de variabilidad del 7,47 % para el sistema 1, un 2,27 % para el sistema 2 y un 2,48 % para el sistema 3.
- Con esta técnica de polimerización se obtuvieron partículas esféricas aglomeradas con diámetros generalmente regulares. Mediante SEM se encontró que las micropartículas están a su vez compuestas por partículas mucho más pequeñas. La formación de estas nanopartículas esféricas dentro de la microesfera se debe a la naturaleza de las interacciones que se presentan entre los componentes que forman el polímero y el solvente pudiéndose generar pequeños aglomerados entre los polímeros en formación (hidrofóbicos) y el solvente (hidrofílico).
- El análisis multivariado indica que la variable más influyente en el rendimiento es la cantidad de entrecruzador y el solvente. Para los MIPs de los tres sistemas se puede observar que las únicas variables que son estadísticamente significativas con un 95 % de certeza son el entrecruzador y la interacción que hay entre el entrecruzador y el solvente.
- En general se obtuvo una retención significativa de DFA por parte de los MIPs de los tres sistemas. Siendo los más altos los encontrados para los sistemas 1 y 2. Esto indica mayores interacciones entre DFA y monómeros básicos. Al comparar MIPs con NIPs se observa que los MIPs presentan superioridad en todos los casos en cuanto a la retención de DFA, esto se debe a la formación de cavidades durante el proceso de síntesis de los MIPs

- Los estudios de retención muestran un parametro en común en cuanto a la retención de DFA. A mayor cantidad de entrecruzador la retención de DFA tiende a ser mayor. Este fenomeno se puede deber a la rigidez que presentan los sitios activos de los MIPs para la adsorción de DFA. Al estar el MIP más entrecruzado, los sitios de adsorción presentan una morfología más óptima para la adsorción de DFA.
- Los estudios cinéticos arrojan que la retención de DFA por parte de los MIPs es prácticamente inmediata, alcanzando un máximo durante los primeros 10 minutos de contacto.
- Las isothermas muestran que el tipo de adsorción de las resinas estudiadas puede ser tanto en monocapa como en multicapa. Al linealizar las isothermas se observa que estas tienen un buen ajuste tanto para la isoterma de Freundlich como la de Langmuir, siendo ligeramente mejor para el caso de Langmuir, los parámetros obtenidos de la isothermas linealizadas de Freundlich indican para los polímeros sintetizados del sistema presentan una superficie mayormente homogénea ya que el parámetro m es mayor a 1 en la mayoría de los casos.
- Tanto los estudios de retención, los estudios cinéticos y las isothermas de adsorción muestran que los MIPs con las mejores capacidades de adsorber DFA corresponden al sistema 2, donde el monómero es VIm.
- Al evaluar las capacidades máximas de carga se concluye que los MIPs presentan mejores capacidades de retener DFA que sus blancos (NIPs), siendo incluso 10 veces mayores, lo que indica una diferencia clara entre MIPs y NIPs. Esta mayor retención por parte de los MIPs se debe a la presencia de las cavidades generadas durante el proceso de síntesis. Esto es un indicativo de que este tipo de sistemas podría ser utilizado en un futuro cercano para preconcentrar residuos orgánicos de disparo, en particular DFA.
- Es posible obtener materiales sintéticos que presenten una elevada adsorción hacia una molécula orgánica como la DFA que esta presente en los residuos orgánicos de disparo. La utilización de este tipo de materiales podría ser de gran utilidad para el análisis de residuos orgánicos de disparo utilizando al técnica de extracción en fase sólida (MIP-SPE).

- Mediante la técnica de síntesis en fase sólida se obtuvieron nanoMIPs con distintas características. La síntesis realizada mediante polimerización UV realizada en medio orgánico dio mejores resultados para moléculas pequeñas, (MEL). Por otra parte, se obtuvieron nanoMIPs sintetizados en medio acuoso mediante iniciación química dando mejores resultados para moléculas con mayor tamaño molecular (Biotina)
- Fue posible modificar microplatos del test de ELISA con una simple deposición y adsorción física de nanoMIPs por evaporación del solvente. Esta modificación es equivalente a una adsorción física de anticuerpos en el test de ELISA.
- Este estudio demuestra que nanoMIPs sintetizados en fase sólida pueden ser utilizados en el desarrollo de nuevos ensayos específicos y sensitivos de ELISA para diferentes moléculas objetivo.
- Los nanoMIPs obtenidos son similares en tamaño, especificidad y solubilidad a los anticuerpos naturales, lo que los hace un material con propiedades de remplazar a los anticuerpos utilizados en aplicaciones *in vitro* en el desarrollo de sensores y también como su uso en potenciales aplicaciones *in vivo*, como transportadores de fármacos y como marcadores fluorescentes.
- Utilizando la síntesis en fase sólida es posible derivatizar los nanoMIPs sintetizados. En este caso se derivatizaron nanoMIPs sintetizados para melamina con PEG. Los beneficios obtenidos son un incremento en la estabilidad de los nanoMIPs en suspensión, la disminución de la agregación de los nanoMIPs, el cambio de polaridad de los nanoMIPs y aumento de la hidrofiliidad, lo que favorece la deposición de éstos en los microplatos.
- Este estudio es el primer esfuerzo para entender qué tipo de moléculas objetivo se pueden utilizar para imprimir nanoMIPs que serán utilizados para remplazar los anticuerpos utilizados en el test de ELISA. La relación entre la naturaleza de las nanopartículas (medio orgánico u acuoso) y la capacidad de adsorción de las nanopartículas en los microplatos es un punto clave. Por último, este estudio arroja ideas acerca del uso de PEG como un escudo protector para las nanopartículas, que puede hacer la interacción entre los nanoMIPs y los microplatos del test de ELISA más efectiva.

CAPITULO V.

DIFUSIÓN DEL TRABAJO

5.1 Publicaciones científicas.

- 1) Autores: Eduardo Pereira*, César Cáceres, Fabiola Rivera, Bernabe Rivas.
Titulo: **“PREPARATION OF HIGHLY MOLECULAR IMPRINTED POLYMER FOR DIFENYLAMINE BY SOLUTION POLYMERIZATION”** J. Chil. Chem. Soc. **2014** Vol.59 no.4 2731-2736
- 2) Autores: C. Cáceres, F. Canfarotta*, I. Chianella, E. Pereira, E. Moczko, C. Esen, A. Guerreiro, E. Piletska, M. J. Whitcombe, S. A. Piletsky .Titulo: **“DOES SIZE MATTER? STUDY OF PERFORMANCE OF PSEUDO-ELISAS BASED ON MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER NANOPARTICLES PREPARED FOR ANALYTES OF DIFFERENT SIZES”**. *Analyst*. **2016**, Vol. 141. 1405-1412.¹⁰⁵
- 3) Autores: Smolinska Katarzyna, Guerreiro Antonio, Canfarotta Francesco, Cáceres César, Whitcombe Michael, Piletsky, Sergey*. Title: **"PERFORMANCE OF ANTIBODIES AND MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER (MIP) NANOPARTICLES IN ELISA – A DIRECT COMPARISON"**. Nombre de la revista: *Analytical Chemistry*. Año:2015. estado: enviado.

5.2 Presentaciones a congresos.

- 1) Autores: Eduardo Pereira, Fabiola Rivera, Gabriela Rodriguez, César Cáceres, Bernabe Rivas.

Titulo: **“Desarrollo y síntesis de Polímeros impresos molecularmente (MIPs) para la retención de los residuos orgánicos de disparo”**

Nombre del congreso: 30th Latin America's Chemistry. modalidad: Poster. Lugar: Cancun Mexico, Octubre 2012

- 2) Autores: Eduardo Pereira, Kevin Martinez, Ines Rodríguez, César Cáceres, Bernabe Rivas. Titulo: **“Polímeros impresos molecularmente (MIPs) para la remoción y separación de residuos orgánicos de disparo”**

Nombre del congreso: XI Encuentro Nacional de Química Analítica y Ambiental. Modalidad: Poster. Lugar: Antofagasta, Chile

- 3) Autores: César Cáceres, Eduardo Pereira, Fabiola Rivera, Bernabe Rivas.

Título: **"Síntesis y desarrollo de polímeros de impresos molecularmente y su uso como extractor en fase sólida para separar remover y preconcentrar residuos orgánicos de disparo"**.

Nombre del Congreso: Sexto Coloquio de Macromoléculas

Modalidad: Oral. Lugar: Termas de Catillo, Chile, noviembre de 2012

4) Autores: Eduardo Pereira, Cesar Cáceres, Kevin Martinez, Bernabé Rivas.

Título: "Polímeros impresos molecularmente (MIPs) para la extracción, separación y preconcentración de moléculas orgánicas"

Nombre del Congreso: Congreso Europeo de Polímeros EPF.

Modalidad: Poster. Lugar: Pisa, Italia Junio de 2013

5) Autores: César Cáceres, Eduardo Pereira, Fabiola Rivera, Bernabé Rivas.

Título: "Optimización de síntesis de polímeros impresos molecularmente, y su aplicación en fase sólida para separar remover y preconcentrar difenilamina"

Nombre del Congreso: 15th Macromolecular complexes IUPAC

Modalidad: Oral. Lugar: Hyatt Regency, Greenville, Carolina del Sur, EE.UU. Agosto 2013

6) Autores: Eduardo Pereira, Cesar Cáceres, Fabiola Rivera, Inés Rodríguez, Bernave Rivas

Título: "Polímeros impresos molecularmente para el reconocimiento de moléculas orgánicas y de iones metálicos"

Nombre del Congreso: 15th Macromolecular complexes IUPAC

Modalidad: Plenaria. Lugar: Hyatt Regency, Greenville, Carolina del Sur, EE.UU. Agosto 2013

7) Autores: Catalina Bravo, Eduardo Pereira, César Cáceres.

Título: "Polímeros impresos molecularmente para la remoción selectiva de la progesterona a partir de matrices acuosas"

Nombre del Congreso: XXX Jornadas Chilenas de química

Modalidad: Poster, Lugar: Gran Hotel Pucón, Chile, Noviembre de 2013

8) Autores: César Cáceres, Eduardo Pereira, Fabiola Rivera, Bernabé Rivas

Título: "Optimización de la síntesis de polímeros impresos molecularmente y su aplicación extractor como fase sólida para separar y preconcentrar difenilamina".

Nombre del Congreso: XXX Jornadas Chilenas de química

Modalidad: Oral, Lugar: Gran Hotel Pucón, Chile, noviembre de 2013

9) Autores: Eduardo Pereira, Cesar Cáceres, Gabriela Rodríguez, Catalina Bravo, Bernabé Rivas.

Título: "Polímeros impresos molecularmente (MIPs) para el reconocimiento de moléculas orgánicas"

Nombre del Congreso: XXX Jornadas Chilenas de química.

Modalidad: Oral, Lugar: Gran Hotel Pucon, Chile, Noviembre de 2013.

10) Autores: César Cáceres, Eduardo Pereira, Ewa Moczko, Michael J. Whitcombe, Sergey A. Piletsky.

Título: "What we can, and what we cannot imprint for the use in the enzyme-linked immunosorbent (ELISA) with nanoMIPs".

Nombre del congreso: The 8th International Congress on Molecular Imprinting-MIP2014 Jiangsu University.

Modalidad: Poster, Lugar: Jiangsu University, Zhenjiang, China, Junio 2014

11) Autores: César Cáceres, Eduardo Pereira, Fabiola Rivera, Bernabe Rivas.

Título: "Synthesis optimization of mips, for use in the recognition of organic gun shot residues".

Nombre del congreso: The 8th International Congress on Molecular Imprinting-MIP2014 Jiangsu University.

Modalidad: Poster, Lugar: Jiangsu University, Zhenjiang, China, Junio 2014

12) Autores: César Cáceres, Eduardo Pereira, Ewa Moczko, Michael J. Whitcombe, Sergey A. Piletsky.

Título: "¿Qué se Puede y qué no se puede imprimir para el uso de inmunoensayos de ELISA con nanoMIPs?"

Nombre del congreso: VII Coloquio de Macromoléculas.

Modalidad: Oral, Lugar: Termas de Catillo, Chile, Noviembre 2014

Bibliografía.

1. K. Horie, M. Barón, R. B. Fox, J. He, M. Hess, J. Kahovec, T. Kitayama, P. Kubisa, E. Maréchal, W. Mormann, R. F. Stepto, D. Tabak, J. Vohlídal, E. Wilks and W. Work, *J. Pure Appl. Chem.*, 2004, **76**, 889-895.
2. M. Janotta, R. Weiss, B. Mizaikoff, O. Brüggemann, L. Ye and K. Mosbach, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2001, **80**, 1029-1036.
3. J.C. Bravo, R. M. Garcinuño, P. Fernández and J. S. Durand, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 1618-1621.
4. <http://mipdatabase.com>).
5. Polyakov and Z. F. Khim., *Zhurnal Fizieskoj Khimii/Akademiya SSSR*, 1931, **2**.
6. L. Pauling, *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 2643-2657.
7. F. H. Dickey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1949, **35**, 227-229.
8. F. H. Dickey, *J. Phys. Chem.*, 1955, **59**, 695-707.
9. S. A. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 4946-4947.
10. A. S. G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1972, **11**, 364-368.
11. T. Takagishi and I. M. Klotz, *Biopolymers*, 1972, **2**, 483-491.
12. L. I. Andersson, B. Selligren and K. Mosbach, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 5211-5214.
13. G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 1812-1832.
14. K. Mosbach and O. Ramström, *Nat. Biotechnol.*, 1996, **14**, 163 - 170.
15. K. M. A.G. Mayes, *Trends Anal. Chem.*, 1997, **16**, 321-332.
16. Y. W. Y. Yuan, M. Huang, R. Xu, H. Zeng, C. Nie, J. Kong, *Anal. Chem. Acta*, 2011, **695**, 63-72.
17. A. G. Mayes and M. J. Whitcombe, *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57**, 1742-1754.
18. K. M. K. Haupt, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 2495-2504.
19. W. P. M. Wyszomirski, *Mol Simul*, 2012, **38**, 892-895.
20. Y. C. Y. Wang, C. Fang, Q. Gong, *Anal. Chem. Acta*, 2010, **673**, 145-150.
21. O. S. Y. Fuchs, K. Haupt, *Anal. Chem. Acta*, 2012, **717**, 7-20.
22. J. Svenson, Nicholls, I.A., *Anal. Chim. Acta.*, 2001, **435**, 19-24.
23. M. Shamsipur, Besharati-Seidani, A., Fasihi, J., Sharghi, H., *Talanta*, 2010, **83**, 674-681.
24. M. Ogiso, Minoura, N., Shinbo, T., Shimizu, T, *Biosens. Bioelectron*, 2007, **22**, 1974-1981.
25. Y. Hoshino, Kodama, T., Okahata, Y., Shea, K.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15242- 15243.
26. Y. Hoshino, Koide, H., Urakami, T., Kanazawa, H., Kodama, T., Oku, N., Shea, K.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6644-6645.
27. Z. Zeng, Hoshino, Y., Rodriguez, A., Yoo, H., Shea, K., *ACS nano.*, 2010, **4**, 199-204.
28. F. Puoci, Iemma, F., Muzzalupo, R., Spizzirri, U.G., Trombino, S., Cassano, R., Picci, N., *Macromol. Biosci*, 2004, **4**, 22-26.
29. I. Bakas, N. Oujji, E. Moczko, G. Istamboulie, S. Piletsky, E. Piletska, I. Ichou, E. Addi and T. Noguer, *Anal. Chim. Acta.*, 2012, **739**, 99-105.
30. G. D. Díaz, D. A. Jiménez, M. B. López, M. L. Castañón, A. M. Ordieres and P. T. Blanco, *Trends Anal. Chem*, 2012, **721**, 68-80.

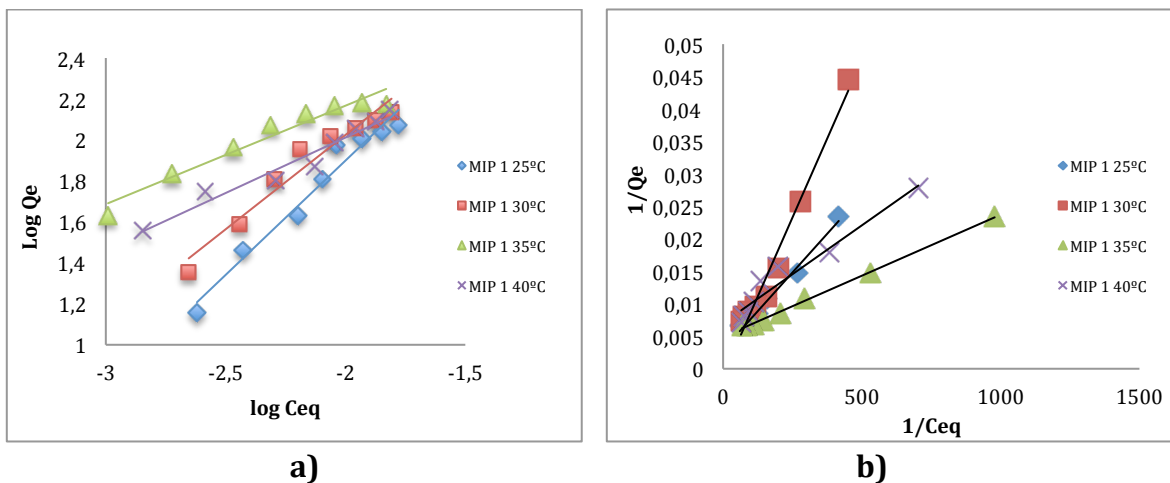
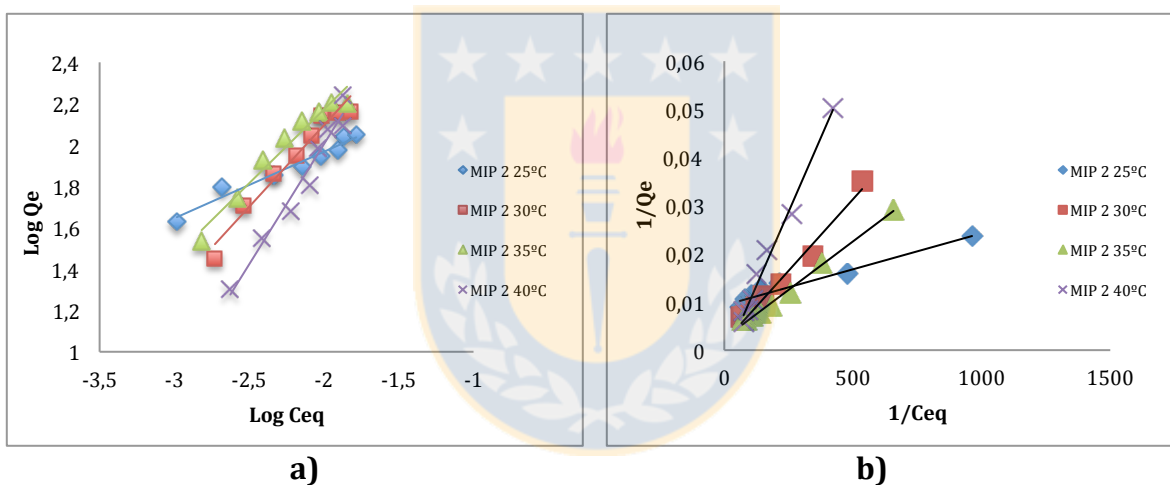
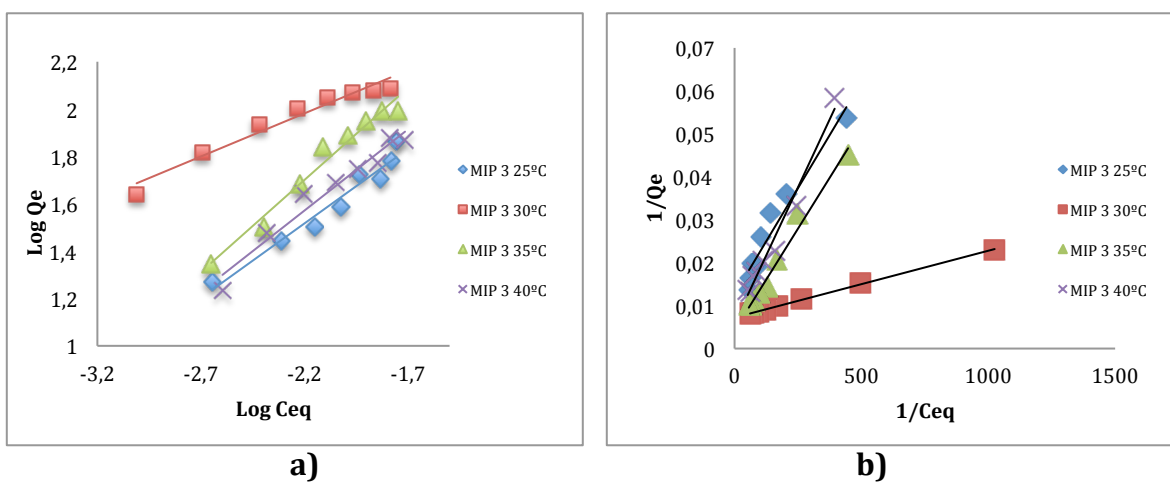
31. B. Sellergren; and L. Andersson, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 3381-3383.
32. R. Arshady and K. Mosbach, *Macromol. Chem*, 1981, **182**, 687-692.
33. E. C. F. A.C. Diasa, V. Grassi, E.A Zagattob, M.A. Arrudaa, *Talanta*, 2008, **76**, 988-996.
34. S. Ambrosini, S. Shinde, E. D. Lorenzi and B. Sellergren, *Analyst*, 2012, **137**, 249-254.
35. T. Takeuchi and J. Haginaka, *J chromatogr B*, 1999, **728**, 1.
36. F. Lanza and B. Sellergren, *Macro mol rapid comm*, 2004, **25**, 59.
37. V. r. Pichon and F. Chapuis-Hugon, *Anal chim acta*, 2008, **622**, 48.
38. D. A. Spivak, *Adv Drug Delivery Rev*, 2005, **57**, 1779-1794.
39. V. Pichon and K. Haupt, *J Liq Chrom Relat Tech*, 2006, **29**, 989-994.
40. O. Brüggemann, Haupt, K., Ye, L., Yilmaz, E., Mosbach, K., *J. Chromatogr. A.*, 2000, **889**, 15-24.
41. V. B. Kandimalla, Ju, H., *Anal. Bioanal. Chem.* , 2004, **380**, 587-605.
42. E. V. Piletska, Guerreiro, A.R., Whitcombe, M.J., Piletsky, S.A., *Macromolecules*, 2009, **42**, 4921-4928.
43. R. A. Lorenzo, Carro, A.M., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, **12**, 4327-4347.
44. N. Pérez-Moral, Mayes, A.G., *Langmuir.*, 2006, **20**, 3775-3779.
45. K. Haupt, Noworyta, K., Kutner, W., *Anal. Commun.*, 1999, **36**, 391-393.
46. L. Cao, Zhou, X.C., Li, S.F.Y., *Analyst*, 2001, **126**, 184-188.
47. C. J. Percival, Stanley, S., Galle, M., Braithwaite, A., Newton, M.I., McHale, G., Hayes, W., *Anal. Chem.* , 2001, **73**, 4225-4228.
48. T. A. Sergeyeva, Slinchenko, O.A., Gorbach, L.A., Matyushov, V.F., Brovko, O.O., Piletsky, S.A., Sergeeva, L.M., Elska, G.V., *Anal. Chim. Acta.*, 2010, **659**, 274-279.
49. N. Wu, Feng, L., Tan, Y., Hu, J, *Anal. Chim. Acta.*, 2009, **653**, 103-108.
50. A. Aghaei, Milani Hosseini, M.R., Najafi, M., *Electrochim. Acta.*, 2010, **55**, 1503-1508.
51. Choong, Bendall and Milne, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 652-656.
52. RNCOS, *Journal*, 2011, 1-130.
53. V. J. B. Ruigrok, Levisson, M., Eppink, M.H.M., Smidt, H., Van Der Oost, J., *Biochem. J.*, 2011, **436**, 1-14.
54. L. Ye, Mosbach, K., *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* , 2002, **723**, 51-59.
55. C. Sulitzky, Rückert, B., Hall, A.J., Lanza, F., Unger, K., Sellergren, B., *Macromolecules.*, 2002, **35**, 79-91.
56. L. Ye, P. A. G. Cormack and K. Mosbach, *Anal commun*, 1999, **36**, 35.
57. Shukla and Thömmes, *Trends Biotechnol.*, 2010, **28**, 253-261.
58. A. C. A. Roque, Lowe, C.R., Taipa, M.Â., *Biotechnol. Prog.*, 2004, **20**, 639-655.
59. D. E. Steinmeyer, McCormick, E.L., *Drug Discov. Today.* , 2008, **13**, 613-618.
60. T. T. Hansel, Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J.A., George, A.J.T, *Nat. Rev. Drug Discov*, 2010, **9**, 325-338.
61. A. G. Mayes, Mosbach, K., *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 3769-3774.
62. N. Pérez-Moral, Mayes, A.G., *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 1798-1803.
63. C. J. Tan, Tong, Y.W., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **389**, 369-376.
64. Y. Ge, Turner, A.P.F, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 8100-8107.
65. G. Wulff, Chong, B.-O., Kolb, U., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 2955-2958.

66. G. Ciardelli, Borrelli, C., Silvestri, D., Cristallini, C., Barbani, N., Giusti, P, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 2329-2338.
67. R. J. Ansell, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2004, **804**, 151-165.
68. K. Yoshimatsu, Reimhult, K., Krozer, A., Mosbach, K., Sode, K., Ye, L, *Anal. Chim. Acta.* , 2007, **584**, 112-121.
69. L. Ye, Cormack, P.A.G., Mosbach., *Anal. Commun.*, 1999, **36**, 35- 38.
70. P. Li, Rong, F., Yuan, C, *Polym. Int.*, 2003, **52**, 1799-1806.
71. D. Vaihinger, Landfester, K., Kräuter, I., Brunner, H., Tovar, G.E.M., *Macromol. Chem. Phys.*, 2002, **203**, 1965- 1973.
72. A. M. Van Herk, Monteiro, M, in *Handbook of radical polymerization.*, ed. K. Matyjaszewski, Davis, T.P., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, 2003, pp. 301-332.
73. A. Poma, A. Guerreiro, M. J. Whitcombe, E. V. Piletska, A. P. F. Turner and S. A. Piletsky, *Adv. Funct. Mater.*, 2013, **23**, 2821-2828.
74. R. J. Umpleby, S.C. Baxter, Y. Chen, R.N. Shah and K. D. Shimizu, *Anal. Chem.* , 2001, **73**, 4584-4591.
75. R. Sips., *J. Chem. Phys.*, 1948, **16**, 490-495.
76. P. Nisonoff A., D., *J. Immunol.* , 1958, 101-106.
77. Larsson A., *Mol. Immunol.*, 1998, **25**, 1239-1249.
78. <http://www.criminalistica.cl>.
79. S. Romolo., F. Morgot. and P. Morgot, *Trends Analyt Chem.*, 2001, **119**, 195-201.
80. C. L. Wallace and C. R. M. Jr, in *Smokeless powder characterization: an investigative tool in pipe bombings in Advances in Analysis and Detection of Explosives*, ed. J. Yinon, Springer, 1 edn., 1993, ch. 29, p. 10.
81. H. H. Meng, Caddy B., *J forensic sci*, 1997, **42**, 552.
82. T. Urbanski, 1967, **3**.
83. M. R. Reardon, W. A. MacCrehan and W. F. Rowe, *J. of Forensic Sci*, 2000, **45**, 1232-1240.
84. D. M. Northrop, W. A. MacCrehan and D. Martire, *Anal Chem*, 1991, **63**, 1038-1045.
85. W.A. MacCrehan, M.R. Reardon and D. L. Duewer, *J forensic Sci*, 2002, **47**, 260-265.
86. S.J. Speers, K. Doolan, J. McQuillan and J.S. Wallace, *J. Chromatogr. A* 1994, **674**, 319-323.
87. J. Y. Z. Wu, X. Zhang, C. Yang, C. Pan, X. Deng, Y. Wen, Z. Xu., *J. Forensic Sci.* , 2001, **45**, 495-502.
88. D. M. Northrop, *J forensic Sci*, 2001, **46**, 549-556.
89. M.R. Reardon and W. A. MacCrehan, *J Forensic Sci*, 2006, **46**.
90. M. Yan, *J. Clin. Ligand Assay.*, 2002, **25**, 234-237.
91. Y. Hoshino, Shea, K.J., *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 3517-3621.
92. N. Lavignac, Allender, C.J., Brain, K.R., *Anal. Chim. Acta.*, 2004, **510**, 6.
93. R. J. Ansell, *J. Chromatogr. B*, 2004, **804**, 151-161.
94. K. Haupt, Dzgoev, A., Mosbach, K., *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 628-631.
95. A. Szenczi, Kardos, J., Medgyesi, G.A., Závodszky, P, *Biologicals*, 2006, **34**, 5-16.

96. K. Ahrer, Buchacher, A., Iberer, G., Jungbauer, A, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2006, **66**, 73-86.
97. J. Omersel, Žager, U., Kveder, T., Božič, B., *J. Immunoassay Immunochem.*, 2010, **31**, 31-45.
98. J. E. Butler, *Methods*, 2000, **22**, 4-22.
99. R. M. Lequin, *Clin Chem*, 2005, **51**, 2415-2427.
100. L. W. Solomon, P. C. Stark, L. Winter, V. Kumar and S. Sinha, *Oral Dis*, 2010, **16**, 151-156.
101. S. X. Leng, J. E. McElhaney, J. D. Walston, D. Xie, N. S. Fedarko and G. A. Kuchel, *J. Gerontol.*, 2008, **63**, 879-885.
102. A. Vieira, *Mol. Biotechnol.*, 1998, **10**, 247-251.
103. I. Chianella, A. Guerreiro, E. Moczko, J. S. Caygill, E. V. Piletska, I. M. De Vargas Sansalvador, M. J. Whitcombe and S. A. Piletsky, *Anal Chem*, 2013, **85**, 8462-8472.
104. I. C. António R. Guerreiro, Elena Piletska, Michael J. Whitcombe, Sergey A. Piletsky, *Biosens Bioelectron*, 2009, **24**, 2740-2743.
105. Cáceres C, Canfarotta F, Chianella I, Pereira E, Moczko E, Esen C, Guerreiro A, Piletska E, Withcombe MJ and P. SA., *The Analyst*, 2016, **141**, 1405-1412.
106. M. K. Henrik Kempe, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 3659-3666.
107. F. R. Orellana, Licenciatura, Universidad de Concepción, 2012.
108. Y. Hoshino, T. Kodama, Y. Okahata and K. J. Shea, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15242-15243.
109. G. Arslan, Özmen, M., Gündüz, B., Zhang, X., Ersöz, M., 2006. , *Turk. J. Chem*, 2006, **30**, 203-210.
110. A. Bossi, Whitcombe, M.J., Uludag, Y., Fowler, S., Chianella, I., Subrahmanyam, S., Sanchez, I., Piletsky, S.A., *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **25**, 2149- 2155.
111. A. R. L. G. S. A. Piletsky, M. J. Whitcombe, World Patent WO2011067563, 2011.
112. D. Jiang, Tang, J., Liu, B., Yang, P., Shen, X., Kong, J., *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**, 1183-1191.
113. T. Shiomi, Matsui, M., Mizukami, F., Sakaguchi, K., *Biomaterials.*, 2005, **26**, 5564-5571.
114. K. Yang, Berg, M.M., Zhao, C., Ye, L., *Macromolecules.*, 2009, **42**, 8739-8746.
115. X. D. Liu, Tokura, S., Haruki, M., Nishi, N., Sakairi, N., *Carbohydr. Polym*, 2002, **49**, 103-108.
116. M. M. Titirici, Hall, A.J., Sellergren, B., *Chem. Mater.* , 2002, **14**, 21-23.
117. Y. M. Jun Matsui, Otto Doblhoff-Dier,tand ToshifumiTakeuchi, *Anal Chem*, 1995, **67**, 4.
118. G. J. W. a. W. F. Bleam, *Envlron Sci Technol*, 1993, **27**, 500-505.
119. K. Haupt, *Anal Chem*, 2003, **75**, 376-382.
120. E. V. P. Sergey A. Piletsky, Kal Karim, Keith W. Freebairn, Coulton H. Legge, and Anthony P. F. Turner, *Macromolecules*, 2003, **35**, 7499-7504.
121. A. G. Sergey A. Piletsky, Elena V. Piletska, Iva Chianella, Kal Karim, and Anthony P. F. Turner, *Macromolecules*, 2004, **37**, 5018-5022.
122. G. Odian, *Radical Chain Polymerization, in Principles of Polymerization*, Fourth Edition edn., 2004.

123. A. R. Kannurpatti, Lu, S., Bunker, G.M., Bowman, C.N., *Macromolecules.*, 1996, **29**, 7310-7315.
124. E. Moczko, A. Guerreiro, E. Piletska and S. Piletsky, *Langmuir*, 2013, **29**, 9891-9897.
125. E. Moczko, A. Poma, A. Guerreiro, I. Perez de Vargas Sansalvador, S. Caygill, F. Canfarotta, M. J. Whitcombe and S. Piletsky, *Nanoscale*, 2013, **5**, 3733-3741.



Anexos.**I) Linealización de las isothermas de adsorción para MIPs y NIPs****Fig N°77:** Isothermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para MIP 1**Fig N°78:** Isothermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para MIP 2**Fig N°79:** Isothermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para MIP 3

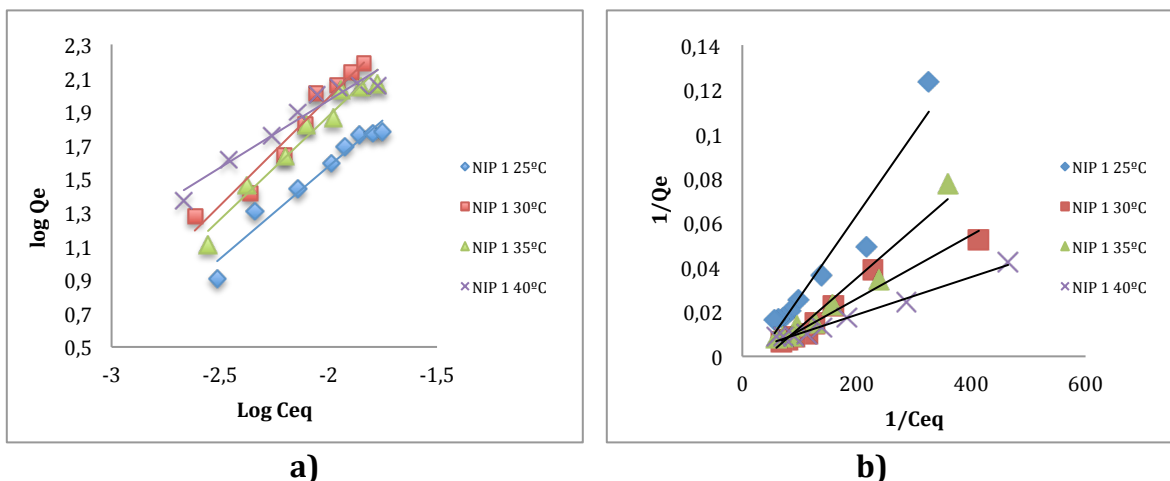


Fig N°80: Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para NIP 1

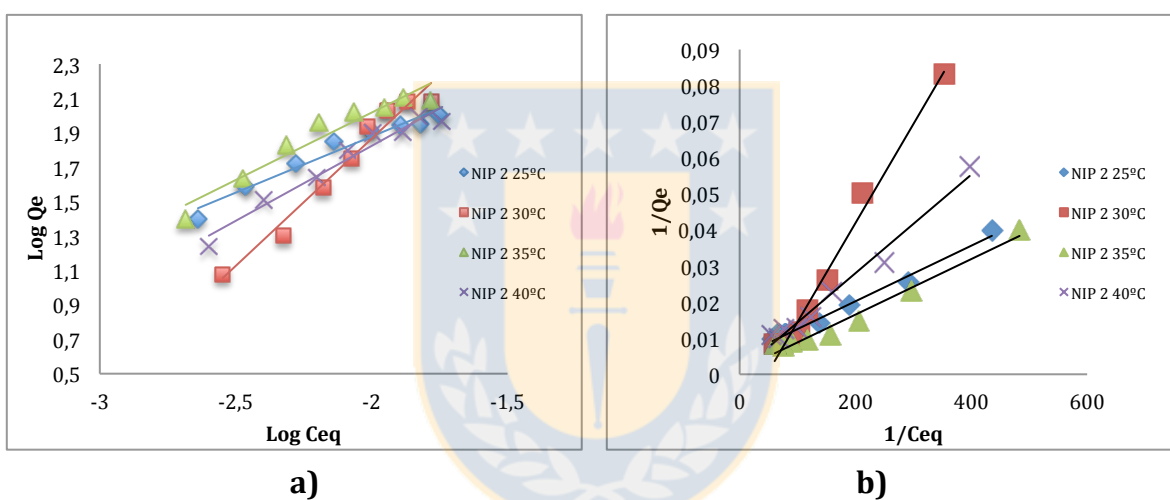


Fig N°81: Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para NIP 2

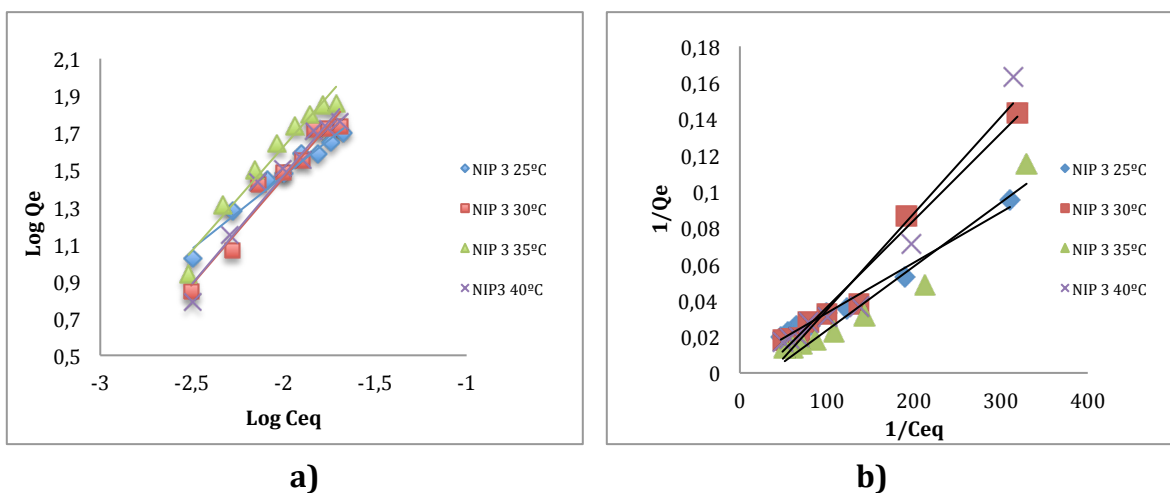


Fig N°82: Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para NIP 3

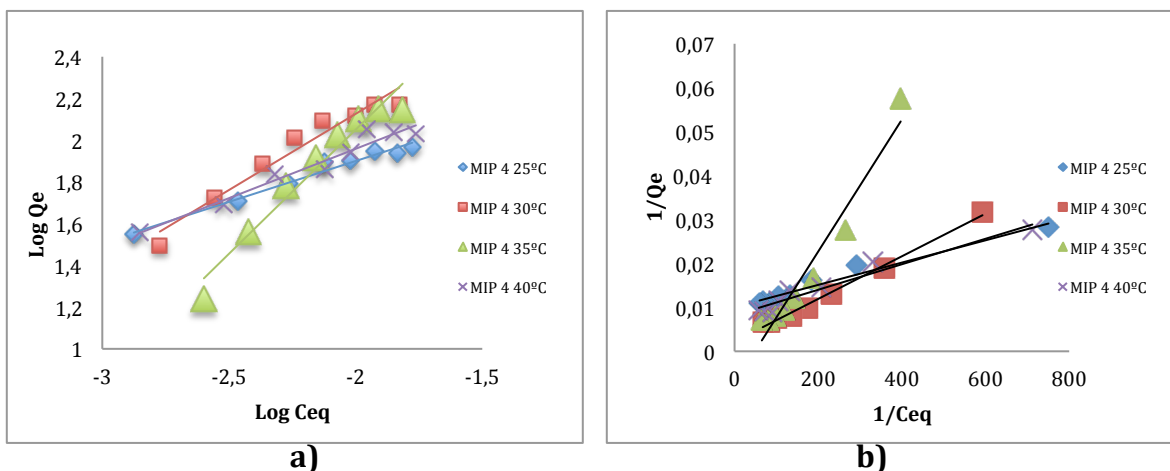


Fig N°83: Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para MIP 4

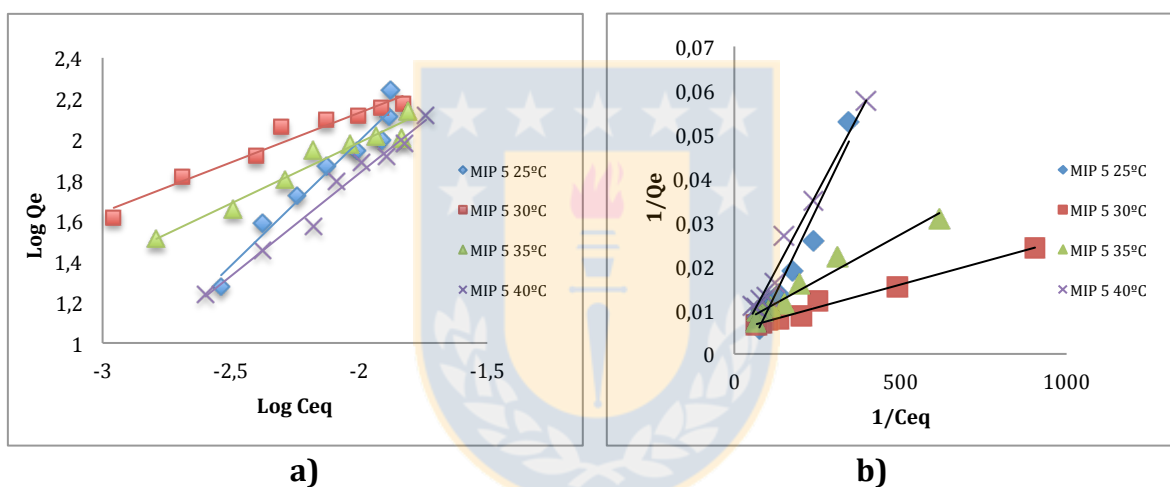


Fig N°84: Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para MIP 5

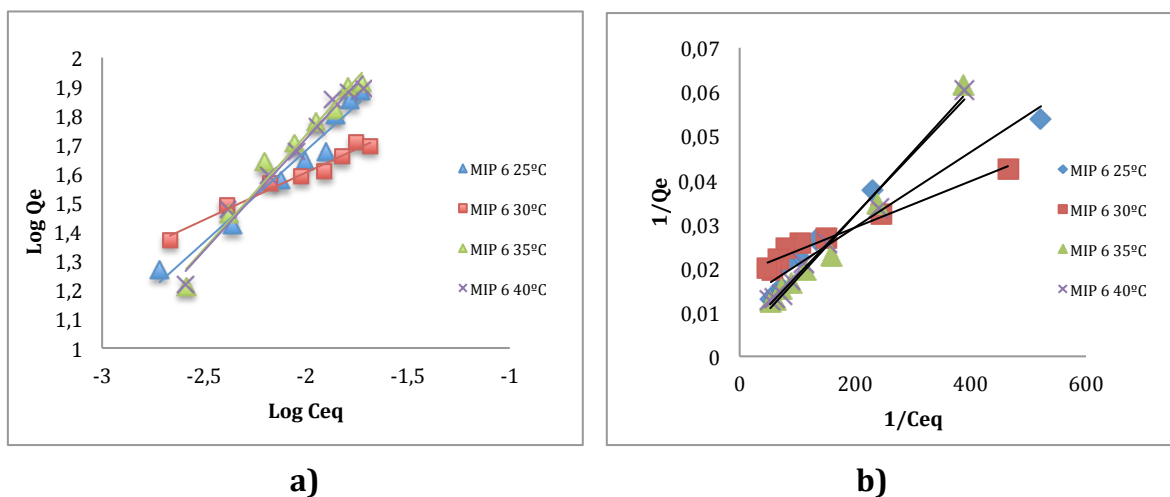


Fig N°85: Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para MIP 6

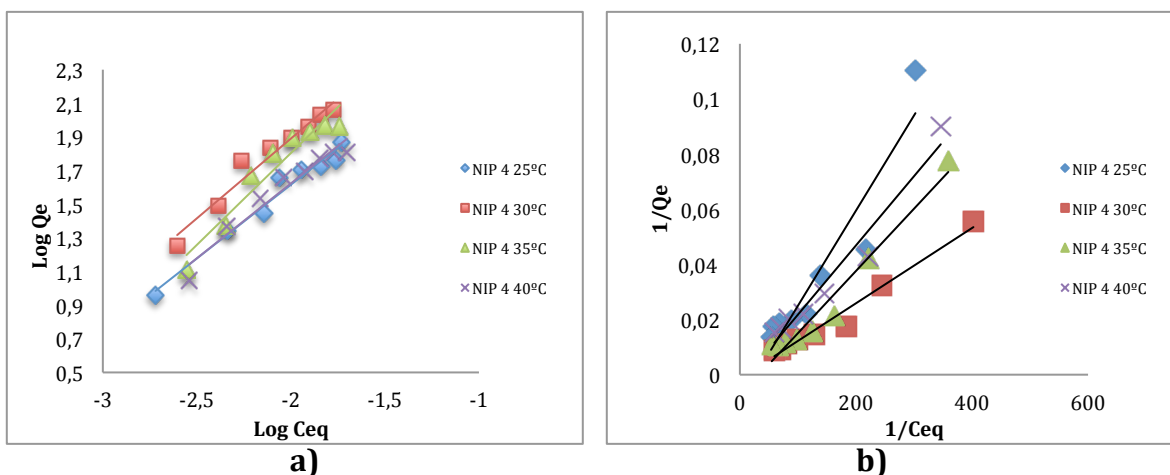


Fig N°86. Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para NIP 4

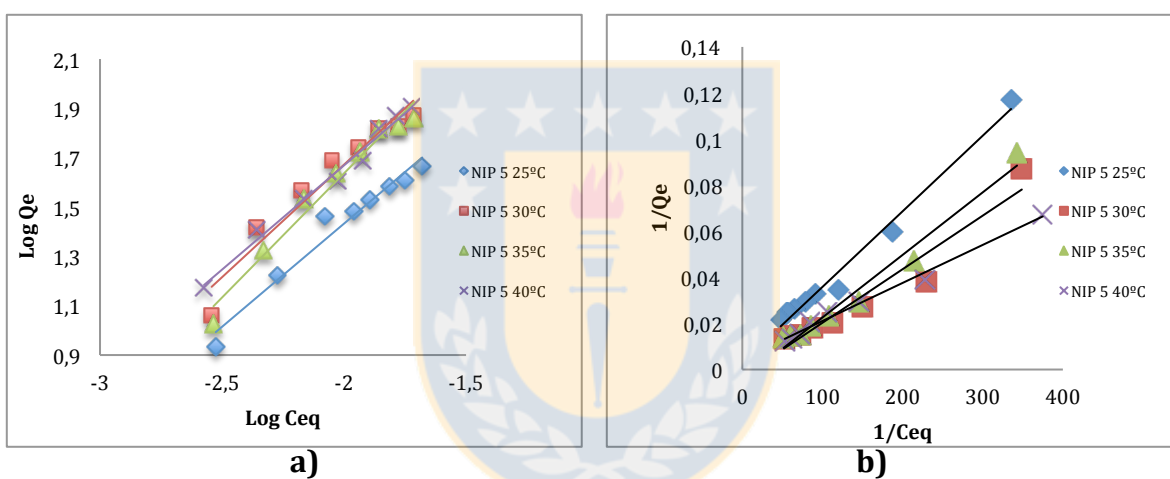


Fig N°87. Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para NIP 5

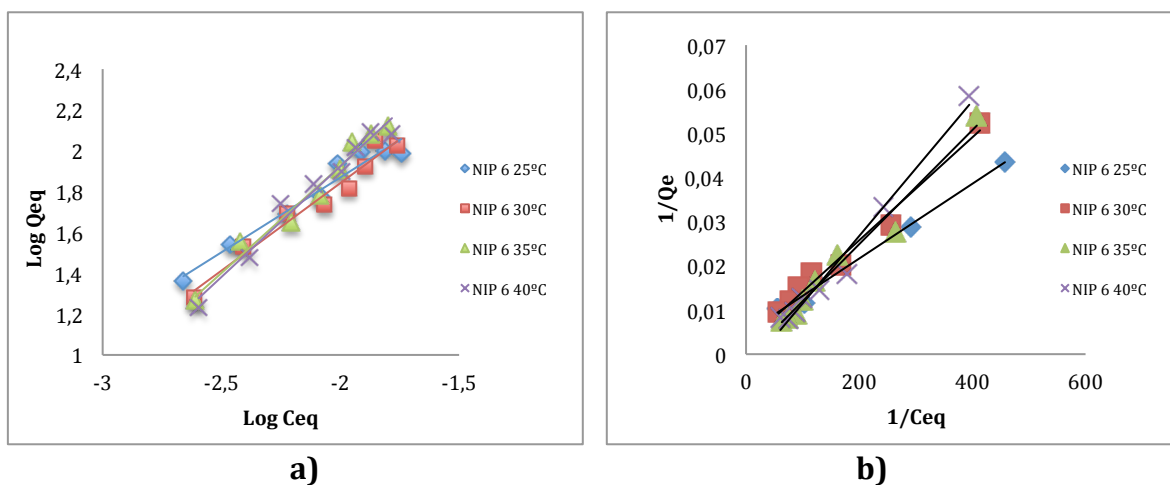


Fig N°88. Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para NIP 6

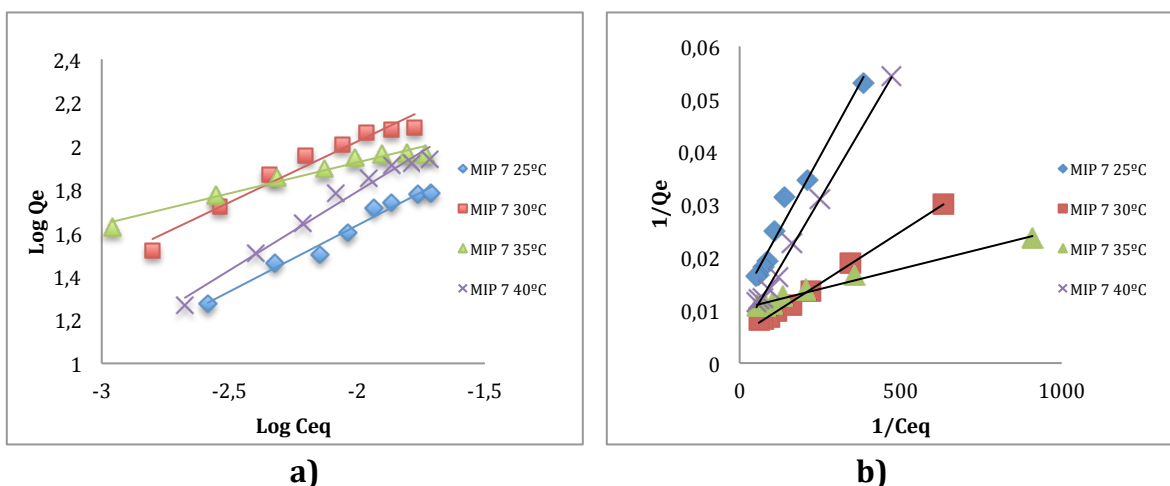


Fig N°89. Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para MIP 7

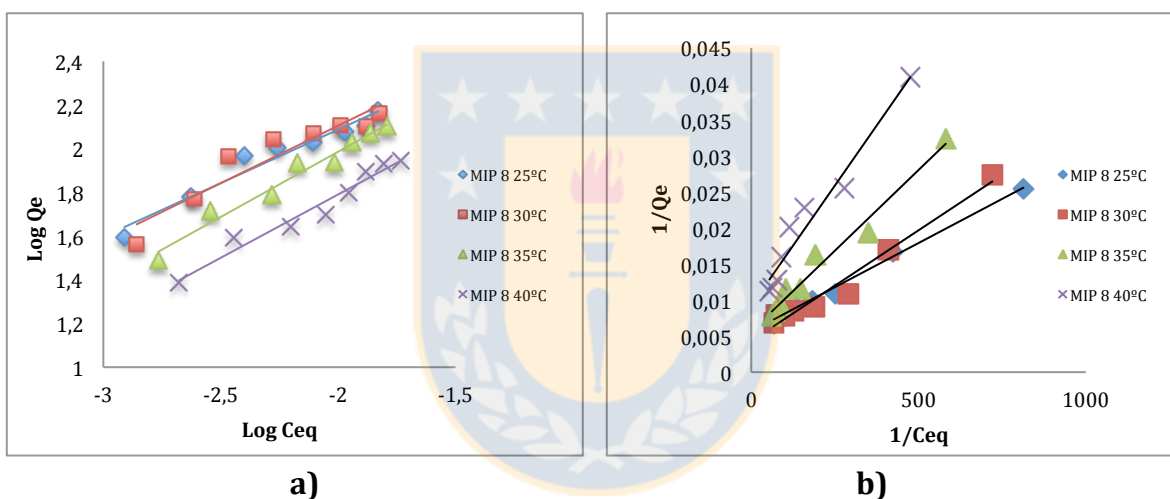


Fig. N°90. Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para MIP 8

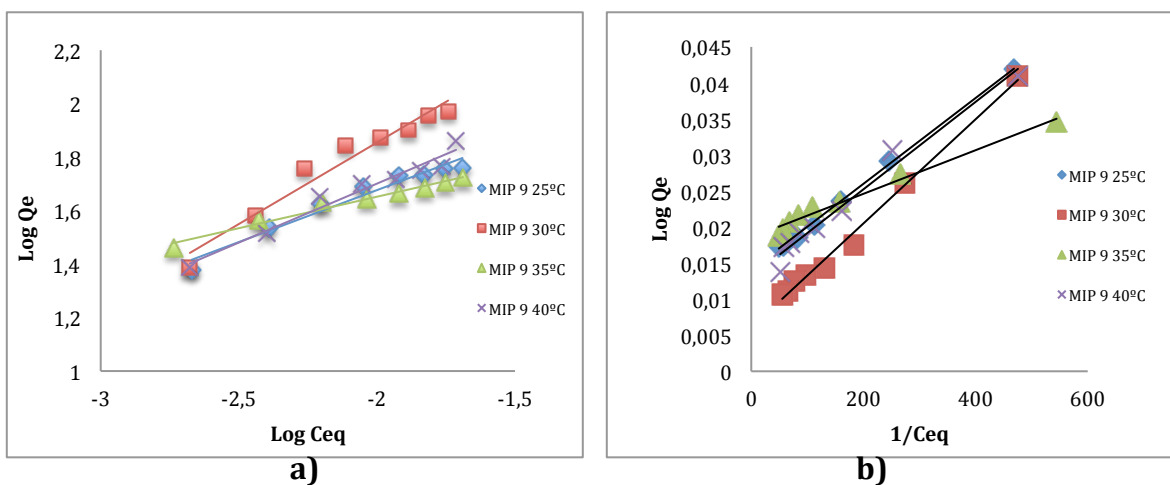


Fig N°91. Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para MIP 9

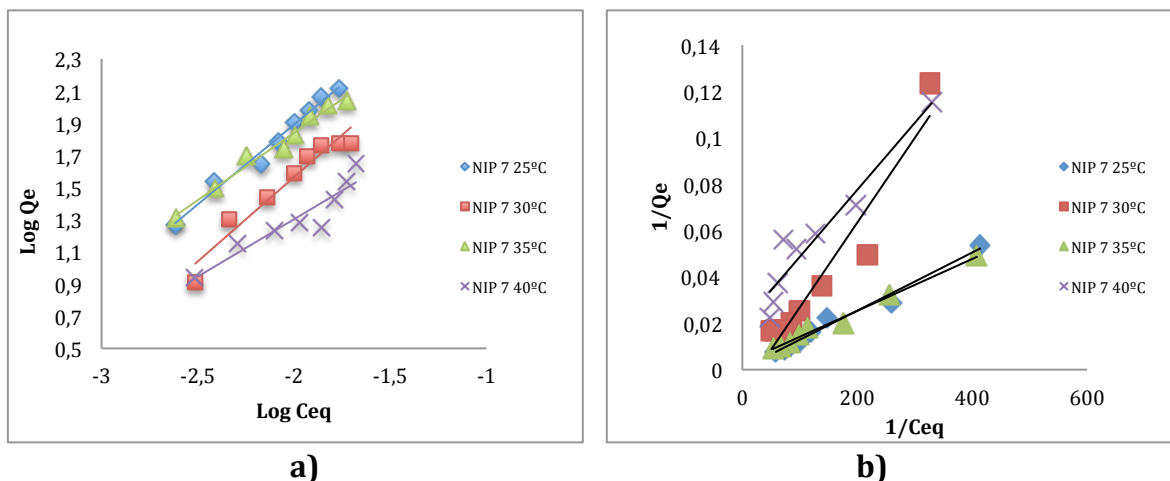


Fig N°92. Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para NIP 7

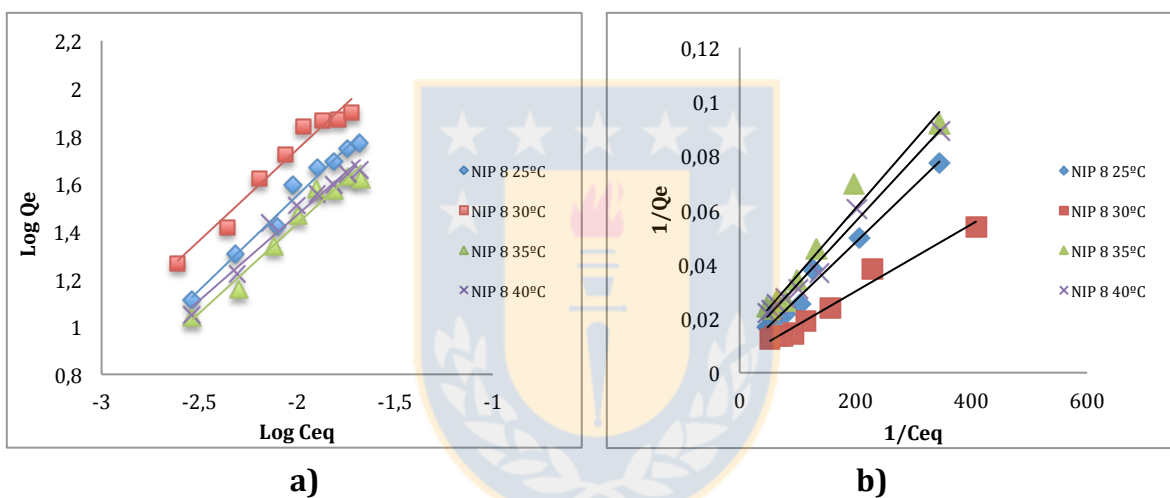


Fig N°93. Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para NIP 8

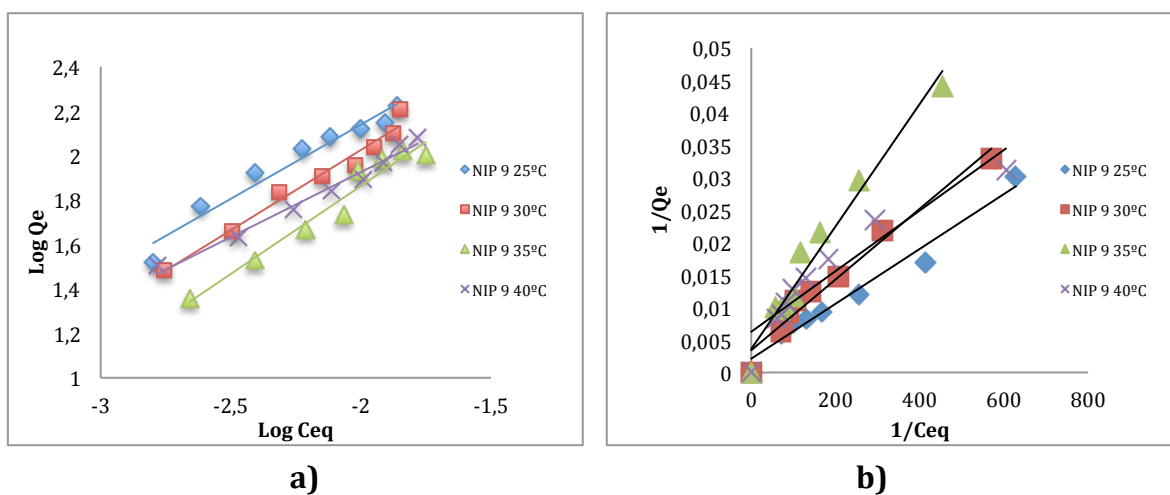


Fig N°94. Isotermas de adsorción linealizada de (a) Freundlich y (b) Langmuir para NIP.



