



Empleo de Polímeros de Impronta Molecular como pre-concentradores de muestras en el análisis químico de trazas

Beatriz E. Soledad-Rodríguez

bsoledad@ucab.edu.ve

Centro de Investigación y Desarrollo de Ingeniería (CIDI). Universidad Católica Andrés Bello. Caracas, Venezuela.

Historia del Artículo

Recibido 05 de Septiembre de 2017

Aceptado 07 de Septiembre de 2017

Disponible online: 07 de Septiembre de 2017

Resumen: Las propiedades de reconocimiento molecular selectivo de los Polímeros de Impronta Molecular (MIPs) los hacen altamente sensibles y con una alta selectividad y afinidad por el analito. La técnica de impresión molecular está basada en la preparación de un polímero altamente entrecruzado alrededor de un analito utilizado como molécula molde o plantilla. Inicialmente el analito se pone en contacto con un monómero adecuado con el fin de formar un complejo de pre-polymerización, posteriormente se le añade el entrecruzante, el iniciador y el disolvente (*porogen*) con el que se lleva a cabo la polimerización. Una vez obtenido el polímero, se extrae la molécula molde, liberando los sitios de reconocimiento específico. Es debido a estos sitios de reconocimiento dentro de la matriz del polímero (complementarios a la molécula bajo análisis en la forma y posición de los grupos funcionales), que ocurre el reconocimiento molecular selectivo. La extracción en fase sólida basada en polímeros de impronta molecular es una técnica frecuentemente utilizada para el análisis de muestras del ambiente, alimentos y bioanalíticas, y se denomina con las siglas en inglés MISPE (*Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*). El análisis de un analito en mezclas complejas, frecuentemente requiere diversos pasos de pretratamiento. Si el compuesto a analizar está presente en muy bajas concentraciones, es necesario que sea concentrado para poderlo detectar por técnicas analíticas estándares. Por otra parte, si la muestra posee otros compuestos, es necesario un paso previo que involucre su limpieza. La extracción en fase sólida es una técnica ampliamente utilizada para el pre-tratamiento de muestras, pues es flexible y fácil de automatizar. En este trabajo se presenta el proceso de impresión molecular y sus aplicaciones en combinación con la extracción en fase sólida, para ser empleada como una alternativa para la pre-concentración de muestras complejas tales como alimentos y ambiente.

Palabras Clave: Análisis de trazas, Polímeros de Impronta Molecular, Extracción en Fase Sólida, MISPE, Pre-concentradores de muestras

Use of Molecularly Imprinted Polymers as Sample Pre-concentrators in Chemical Trace Analysis

Abstract: The selective molecular recognition properties of the Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) make them highly sensitive and with high selectivity and affinity for the analyte. The molecular imprinting technique is based on the preparation of a highly crosslinked polymer around an analyte used as a template or template molecule. Initially the analyte is contacted with a suitable monomer in order to form a prepolymerization complex, subsequently is added the cross-linker, the initiator and the solvent (*porogen*) with which the polymerization is carried out. Once the polymer is obtained, the template molecule is extracted, releasing the specific recognition sites. It is because of these recognition sites within the polymer matrix (complementary to the molecule under analysis in the form and position of the functional groups) that selective molecular recognition occurs. Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction (MISPE) is a technique frequently used for the analysis of environment, food and bioanalytical samples. Analyzing an analyte in complex mixtures often requires several pretreatment steps. If the compound to be analyzed is present in very low concentrations, it must be concentrated to be detected by standard analytical techniques. On the other hand, if the sample has other compounds, a previous step that involves its cleaning is necessary. Solid-phase extraction is a widely used technique for pre-treatment of samples, since it is flexible and easy to automate. This paper presents the molecular printing process and its applications in combination with solid phase extraction, to be used as an alternative for the pre-concentration of complex samples such as food and environment.

Keywords: Trace Analysis, Molecularly Imprinted Polymers, Solid Phase Extraction, MISPE, Sample Pre-concentrators

I. INTRODUCCIÓN

La elaboración de polímeros sintéticos altamente estables, llamados polímeros de impronta molecular (MIPs, *Molecularly Imprinted Polymers*), es una tecnología emergente llamada impresión molecular, que conduce a polímeros que poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo debido a que los sitios de reconocimiento dentro de la matriz del polímero son complementarios al analito en la forma y posición de los grupos funcionales, y se basa en los modelos de funcionamiento de los sistemas biológicos de los seres vivos con relación al reconocimiento molecular selectivo tales como: antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac), enzimas y sustratos, hormona y receptor. Estos materiales sintéticos son capaces de interactuar de forma selectiva con los analitos y el reconocimiento molecular entre el receptor (anfitrión) y el sustrato (invitado) en una matriz conteniendo moléculas relacionadas estructuralmente, requiere discriminación y enlazamiento. Esto ocurre solamente si los sitios enlazantes del anfitrión y las moléculas invitadas se complementan unas con otras en tamaño, forma, y funcionalidad química, haciendo que sean especialmente adecuados para la detección y cuantificación de contaminantes en la Química Analítica.

En los últimos años el avance que ha experimentado esta tecnología ha sido muy grande, y se han publicado numerosos estudios empleándolos con diferentes propósitos. En la Figura 1 se presentan los trabajos realizados y recopilados por la Sociedad para la Impresión Molecular (*Society for Molecular Imprinting* http://mipdatabase.com/all_items.php) [1] desde 1930 hasta nuestros días.

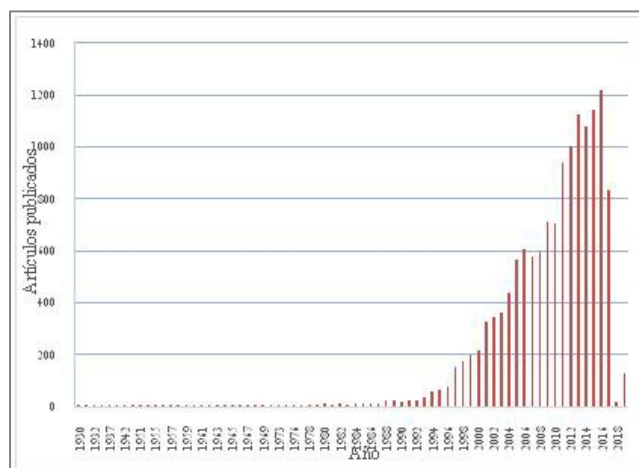


Figura 1. Trabajos publicados relacionados con polímeros de impronta molecular recopilados de la Sociedad para la Impresión Molecular (Society for Molecular Imprinting http://mipdatabase.com/all_items.php)

Debido a la importancia de la preparación de la muestra en el análisis de compuestos presentes en muy baja concentración, este trabajo presenta una revisión del proceso de impresión molecular y la aplicación de los polímeros de impronta molecular como adsorbentes para la separación y purificación de muestras por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinada con la extracción en fase sólida con polímeros de impronta molecular (MISPE).

II. METODOLOGÍA

El análisis de compuestos en baja concentración ha adquirido cada vez mayor importancia y, dada la necesidad de identificar y cuantificar los analitos, en este trabajo se efectuó una revisión bibliográfica utilizando diversas fuentes documentales sobre el análisis de compuestos en muy bajas concentraciones y el empleo de los Polímeros de Impronta Molecular en combinación con la Extracción en Fase Sólida para la pre-concentración de diferentes muestras con concentraciones muy bajas del analito.

III. DESARROLLO

a. *Proceso de impresión molecular*

La técnica de impresión molecular se basa en la síntesis de polímeros estables con propiedades de reconocimiento molecular hacia los compuestos para los cuales fueron generados. Para ello, es necesario que la polimerización se lleve a cabo en presencia del analito que se va a determinar (analito plantilla o molécula molde). Posteriormente, estos polímeros se utilizan para la separación de dicho analito y compuestos similares de una mezcla más o menos compleja de sustancias. Dicho reconocimiento se basa en la creación, durante el proceso de polimerización, de cavidades que son complementarias, en tamaño y forma, al analito plantilla [2]

A principios del siglo XX, el investigador ruso *Polyakov* quería conseguir un aumento de la capacidad de la sílica para ser utilizada como fase estacionaria en cromatografía y estudiar el efecto que podían tener ciertos disolventes (benceno, tolueno y xileno) en el tamaño y estructura del poro o su superficie específica, para ello se acidulaban distintas disoluciones de silicato sódico con diferentes sustancias, y se formaba una matriz rígida de partículas de sílica después del secado. Una vez seca, se eliminaban los aditivos lavando con agua caliente. *Polyakov* observó que al emplear $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ como agente acidificante aumentaba la adsorción por parte de la sílica del aditivo con el que se había preparado, lo cual no ocurría con los otros aditivos empleados, sugiriendo esto que el aumento en la selectividad observado se debía a un cambio estructural en la sílica originado por la naturaleza química de los aditivos utilizados en su preparación [3, 4]. Posteriormente, *Dickey* realiza unos experimentos que demuestran el reconocimiento selectivo por parte de la sílice de diferentes colorantes derivados del naranja de metilo que se encontraban presentes durante la obtención del gel de sílice, y propone un mecanismo similar al propuesto por *Linus Pauling* en 1940, para la formación de anticuerpos usando moléculas de antígeno como plantilla [5, 6].

Los materiales de sílica mostraban baja estabilidad y reproducibilidad, por lo que el avance de esta línea de investigación fue escaso. En trabajos

efectuados con enzimas inmovilizadas, *Mosbach* investigó una técnica para atrapar enzimas y microorganismos en un polímero sintético entrecruzado, una vez sintetizado el material y extraídas las enzimas de la red polimérica, investigó si este poseía la capacidad de retener de nuevo a aquellas que fueron inmovilizadas en él inicialmente, obteniendo que la retención fue 30 % mayor a la obtenida en las enzimas libres [7].

En los años 70, *Takagishi* y *Klotz* [8] estudiaron las interacciones de moléculas pequeñas y macromoléculas introduciendo sitios de unión en polietilenimina por entrecruzamientos de disulfuro. Después del entrecruzamiento de los polímeros, se eliminó el naranja de metilo enlazado y se evaluó su capacidad de unirse nuevamente a esta molécula. El polímero entrecruzado en presencia de naranja de metilo mostró más sitios de unión y enlazamiento más fuerte que el polímero entrecruzado sin anaranjado de metilo. Señalaron los autores que la conformación del polímero parecía ser moldeada para proporcionar sitios que pudieran acomodar una pequeña molécula específica. *Wulff* y *Sarhan* [9] por su parte, trabajaron en el uso de polímeros con estructuras análogas a las enzimas para la resolución de racematos, *Nishide* y *Tsuchida* [10] estudiaron la adsorción selectiva de iones metálicos sobre resinas de poli (4-vinilpiridina) en las cuales la cadena del ligando fue inmovilizada por entrecruzamiento, iniciándose la investigación de polímeros orgánicos sintéticos con impresión molecular. *Shea* y *Thompson* [11] efectuaron la síntesis de macromoléculas con moléculas molde, y los estudios de re-enlazamiento sugirieron que los grupos funcionales eran capaces de retener alguna información estereoquímica presente en la molécula.

Para los años 80, se consiguió la estabilización mecánica de conformación molecular por el atrapamiento en una matriz polimérica [12], y el efecto pudo explicarse por la estabilización de la conformación inicial de la molécula compleja por la matriz de polímero formado por el complejo que actuaba como molécula plantilla. Estudios sobre la memoria de un copolímero de estireno-divinilbenceno altamente entrecruzado [13] indicaron que los polímeros de vinilo sintetizados a

partir de los diastereoisómeros de ácido truxínico y truxílico fueron capaces de reconocer el estereoisómero añadido durante su síntesis.

Con relación al reconocimiento de iones metálicos se prepararon resinas de poli (1-vinilimidazol) con iones metálicos tales como Ni^{+2} , Co^{+2} , o Zn^{+2} , usados como moléculas molde para estudiar la adsorción de iones metálicos, encontrándose que esas resinas adsorbieron más efectivamente los iones metálicos que la resina preparada sin la molécula molde [14].

Gupta y Neckers [15] prepararon varios copolímeros con divinilbenceno y encontraron que cuando la polimerización se lleva a cabo en presencia de iones metálicos tales como Ni^{+2} , Co^{+2} y Cu^{+2} , al remover con ácido al ion metálico del copolímero que lo contenía, este último retuvo la memoria del metal quelante con el cual fue sintetizado. *Shirai y Tanaka* [16] prepararon poliésteres con unidades de p-fenileno diacrilatos como grupos fotodimerizables y unidades de oxietileno como sitios de enlazamiento del catión. Encontraron que el orden de selectividad del catión para todos los polímeros usados fue $\text{K}^+ \approx \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+$. Al ser irradiados con luz ultravioleta, los polímeros se hicieron insolubles. La habilidad de enlazamiento para los cationes alcalinos, especialmente para K^+ y Rb^+ , se incrementó cuando estuvo presente el acetato de potasio en el entrecruzamiento fotoquímico cuando fueron comparados con aquellos polímeros preparados con entrecruzamiento sin la molécula molde.

Kuchen y Schram [17] prepararon resinas de intercambio selectivas a Cu^{+2} con metacrilatos y lograron remover los iones cúpricos de aguas residuales bajando los niveles por debajo del límite de detección, con esto lograron mostrar que los complejos metálicos presentes durante la polimerización, imprimen la estructura de la cavidad de la resina de manera tal que los iones del mismo elemento son atrapados de forma preferente en las cavidades del polímero después de la elución de estos iones metálicos. *Inoue y colaboradores* [18] estudiaron la dependencia del pH en la adsorción de varios iones metálicos sobre una resina preparada por el entrecruzamiento de Cu^{+2} acompañado con quitosano, y lograron separaciones

por la resina de galio e indio del zinc, el ion férrico y aluminio del zinc y níquel del cobalto, con una alta selectividad. Otros estudios con el ion Cu^{+2} y la síntesis de polímeros basados en 4-Vinilpiridina, se reportan en [19, 20]

Con respecto a la separación de enantiómeros empleando polímeros de impronta molecular, *Sarhan* [21] estudió la separación racémica de ácido amigdalínico en polímeros con espacios quirales. *Sarhan y Wulff* [22], estudiaron la estereoespecificidad del enlazamiento utilizando polímeros con ácido D, L-glicérico como molécula molde. *Wulff, Poll y Minarik* [23] también estudiaron polímeros para la resolución racémica encontrando polímeros con una alta selectividad para la resolución racémica. *Wulff, Vietmeier y Poll* [24] estudiaron el efecto de la naturaleza de los agentes de entrecruzamiento en polímeros impresos con la molécula molde, en la selectividad de una resolución racémica y encontraron que el etilendimetacrilato fue el mejor agente entrecruzante. La mayor selectividad se alcanzó con polímeros preparados con 70 a 95 % de agente entrecruzante en la mezcla monomérica. Los autores encontraron un fuerte efecto de la temperatura sobre la resolución racémica, mostrando una selectividad óptima a 75 °C. *Wulff y Poll* [25] investigaron la influencia de la estructura sobre la selectividad de la resolución racémica, sobre los sitios de enlazamiento en polímeros impresos con la molécula molde, tomando a ácidos borónicos como los sitios de enlazamiento. Encontraron una relación inversa entre la flexibilidad de los sitios de enlazamiento y la selectividad de la resolución racémica.

En el estudio de polímeros de impronta molecular con reconocimiento de aminoácidos, se tienen los trabajos de *Andersson, Sellergren, y Mosbach* [26], que imprimieron derivados de aminoácidos en polímeros macroporosos de etilfenil alanina. Por otra parte, *Fujii y colaboradores* [27] sintetizaron polímeros con estireno y divinilbenceno formando cavidades específicas para aminoácidos quirales, una vez sintetizado lo trataron con ácido clorhídrico y al estar en contacto con una mezcla de D y L fenilalanina, el polímero tomó solamente a la D-fenilalanina. *Wulff, Best y Akelah* [28] construyeron

polímeros análogos a las enzimas con cavidades quirales con forma específica, con grupos de enlace en ordenamiento estereoquímico definido empleando L-fenilalanina o L-fenilalanina-anilida como molécula molde, encontrando que los polímeros sintetizados fueron capaces de resolver el racemato de la molécula molde utilizada. También *Andersson, Ekberg, y Mosbach* [29] sintetizaron polímeros acrílicos selectivos a aminoácidos, y *Sellergren, Ekberg y Mosbach* [30] prepararon polímeros acrílicos macroporosos selectivos para esteroides de la D o L-fenilalanina por un procedimiento de impresión no covalente utilizando interacciones coulombicas durante la polimerización entre la molécula impresa y el grupo carboxilo llevado por los monómeros vinilo. Después de la remoción de la molécula molde, fueron evaluados en un procedimiento cromatográfico para examinar su selectividad enantiomérica encontrando que la selectividad persistió en el polímero durante algunos meses.

La preparación de MIPs siguiendo el modelo covalente se ha basado en los trabajos de *Wulff* y su equipo [31] y actualmente hay mucho interés en el diseño, preparación y caracterización de nuevos materiales receptores sintéticos capaces de imitar los procesos biológicos de reconocimiento molecular, entre los que se encuentran los polímeros de impronta molecular (MIPs).

En términos generales, la técnica de impresión molecular se basa en la preparación de un polímero altamente entrecruzado alrededor de un analito plantilla. Para ello, se pone inicialmente en contacto un monómero adecuado con el analito con el fin de formar un complejo de pre-polimerización, al que posteriormente se le añade el entrecruzante, el iniciador y el disolvente (porogen) con el que se lleva a cabo la polimerización. Una vez obtenido el polímero, se extrae el analito plantilla, liberando los sitios de reconocimiento específico.

Las principales ventajas de los MIPs en comparación con las sustancias naturales de reconocimiento específico son su estabilidad, su facilidad de elaboración y que pueden sintetizarse de forma selectiva para cualquier molécula.

Entre los parámetros a optimizar en la síntesis de los polímeros generados por impresión molecular se

encuentran: selección de la naturaleza y cantidad de monómero, iniciador, entrecruzante y porogen, la forma de iniciación de la polimerización, la metodología empleada así como la forma y el tamaño del analito plantilla, entre otros.

Moléculas molde o *template*

Existe una amplia variedad de compuestos que pueden ser utilizados en la preparación de un MIP; moléculas tales como drogas, aminoácidos, carbohidratos, proteínas, hormonas, pesticidas, antibióticos, entre otros, han sido utilizadas exitosamente para la preparación de matrices de reconocimiento selectivo [32].

Para la síntesis de un MIP, el primer responsable para la elección de los diferentes componentes es el analito. Es necesario considerar que en la medida que aumenta el tamaño del analito, menor es la probabilidad que la cavidad que se forme esté bien definida y sea selectiva para esa molécula. Además, las moléculas de gran tamaño encontrarán impedimentos estéricos mayores que aquellas de menor tamaño cuando se está produciendo su difusión a través de la matriz polimérica, durante los procesos de reconocimiento o extracción.

Rachkov y Minoura [33] señalan que puede sintetizarse un material que solo reconozca una zona característica de la molécula, de igual forma que lo hacen los anticuerpos con el antígeno.

Monómeros funcionales

La selección del monómero más adecuado se debe realizar en función de las características y grupos funcionales del analito, con el que se debe formar un complejo de pre-polimerización estable. Además, es deseable que entre el analito y el monómero se den interacciones complementarias que aumenten la afinidad y la selectividad de las cavidades generadas [34].

La relación molar entre la molécula molde y el monómero funcional debe encontrarse cercana a 1:4 y si se añade un exceso de monómero, esto puede ocasionar la formación de interacciones no específicas con el analito.

Los monómeros funcionales típicos usados en la preparación de MIPs son los ácidos carboxílicos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido 4-

vinilbenzoico), los ácidos sulfónicos (ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico) y bases heteroaromáticas débiles (2-vinilpiridina, 4-vinilpiridina, 1-vinilimidazol). Estos se presentan en la Figura 2.

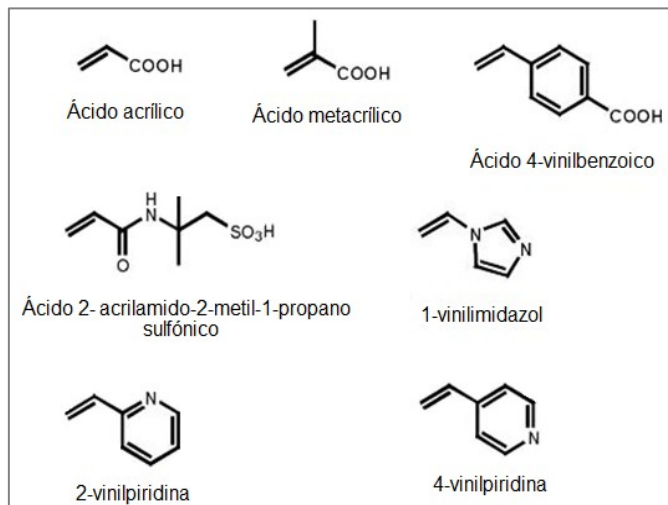


Figura 2. Monómeros funcionales típicos.

Para interacciones quelatantes de metales, se usa comúnmente un derivado del ácido iminodiácético. Otra posibilidad que ha sido utilizada es la de los polímeros preparados con una estrategia basada en polisiloxano, usando varios silanos como monómeros.

Entrecruzante

La selectividad está altamente afectada por el tipo y cantidad de agente entrecruzante usado en la síntesis del polímero impreso. El entrecruzante es el responsable de la generación del polímero tridimensional, así como de la estabilización de los sitios de enlazamiento, y de proporcionarle la estabilidad mecánica a la matriz del polímero [35], esto le permitirá al polímero un reconocimiento molecular adecuado.

A pesar de existir un alto grado de agentes entrecruzantes, solo un número limitado de ellos son utilizados; la solubilidad del entrecruzante por sí mismo en la solución prepolimérica y la solubilidad de la especie molde monomerizada reduce el número de posibles alternativas.

Entre los entrecruzantes más utilizados se destacan el etilenglicol dimetacrilato, el 4-divinilbenceno, el trietilenglicol dimetacrilato, el trimetilopropano trimetacrilato, el metilen-bis-acrilamida y el etilen-bis-acrilamida (Figura 3).

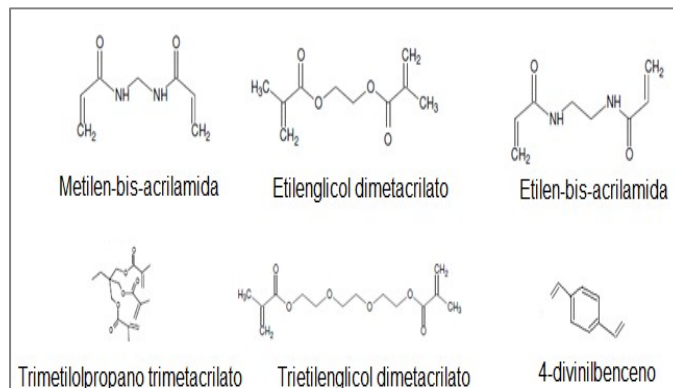


Figura 3. Entrecruzantes comúnmente empleados en la síntesis de polímeros de impronta molecular

Iniciador

Una vez preparada la mezcla de reactivos, comienza la polimerización en presencia de un iniciador que da inicio al proceso de polimerización por radicales libres. Entre las moléculas iniciadoras, se utilizan entre otras el peróxido de benzoilo (PB), los de tipo azo, como el 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN) o el azodimetilvaleronitrilo cuando el inicio de la polimerización es por calor, uno de los más utilizados es el AIBN, ya que se descompone en radicales tanto por la acción de la radiación UV, como por el calor a temperaturas superiores a 60°C [36]. También se emplean el peróxido de hidrógeno, el peróxido de acetilo, el peróxido de laurilo y el *t*-butil peracetato, en función del método de iniciación empleado, radiación ultravioleta o por acción del calor.

Disolvente porogénico o porogen

El disolvente porogénico juega un papel importante durante el proceso de impresión molecular pues gobierna la fuerza de las interacciones no-covalentes aunado a su influencia en la morfología del polímero.

El porogen debe cumplir con ciertos requisitos: en primer lugar, la molécula molde, el iniciador, el

monómero funcional y el entrecruzante deben ser solubles en el disolvente porogénico. Además, éste debe ser capaz de producir grandes poros para asegurar las buenas propiedades de intercambio del polímero resultante. Por último, el disolvente porogénico debe ser de baja polaridad, para reducir las interferencias durante la formación del complejo entre la molécula a imprimir y el monómero, para que exista una alta selectividad del polímero.

Se puede asumir que mientras más polar sea el porógeno, más débil se hace el efecto de reconocimiento resultante como consecuencia de la influencia de la polaridad del solvente sobre las interacciones no covalentes. Los porógenos con los cuales se obtiene la mejor impresión, son aquellos de muy baja constante dieléctrica, tales como el tolueno y el diclorometano. Por otra parte, también el porógeno influencia la estructura de los polímeros preparados, siendo el tamaño del poro dependiente del tipo de porógeno utilizado.

En la preparación de un polímero de impronta molecular, por lo general se utiliza como disolvente el mismo porogen de la polimerización, o al menos de características similares.

b. Preparación de los polímeros de impronta molecular

El procedimiento seguido para la preparación de los polímeros de impronta molecular es el siguiente: En primer lugar, se ponen en contacto la molécula molde con un monómero funcional adecuado para formar un complejo de prepolimerización, posteriormente se le añade el entrecruzante, el iniciador y el disolvente (porogen) para que tenga lugar la polimerización. Una vez sintetizado el polímero, se extrae la molécula molde, dejando libres los sitios de reconocimiento específico [35, 37, 38].

Estos pasos se presentan en la Figura 4.

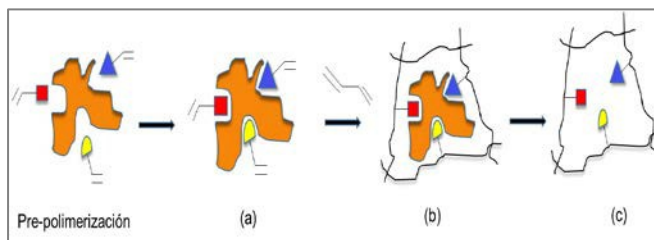


Figura 4. Principales pasos involucrados en la preparación de un Polímero de Impronta Molecular.

En el paso (a) se realiza la mezcla o enlazamiento de uno o varios monómeros funcionales con la molécula molde o *template* (en anaranjado) en una cantidad adecuada de solvente o líquido de dispersión. En este paso se forma o bien un conjugado covalente (impresión covalente) o un agregado no covalente (impresión no covalente).

Posteriormente, en el paso (b) se efectúa la polimerización del monómero en presencia de un entrecruzante para preparar una red del polímero en la cual los monómeros funcionales se fijan alrededor de la molécula molde.

Por último en el paso (c) se procede a la eliminación de la molécula molde de la matriz polimérica, y de este modo se liberan las cavidades creadas en la matriz que son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al analito utilizado como molécula molde. La presencia de estas cavidades, hace que el MIP sea capaz de reconocer de forma selectiva al analito y, eventualmente, a otros compuestos estructuralmente análogos. La eliminación de la molécula molde se consigue mediante diferentes procesos de lavado, la extracción sólido-líquido, la extracción por el método *Soxhlet*, por tratamiento térmico, la digestión en microondas, reacciones químicas que destruyan la molécula molde, entre otros.

Como se describió anteriormente, el método de impresión molecular dependerá de la naturaleza del agregado formado entre el monómero funcional y el *template*.

A continuación se describen el modelo de impresión covalente y el modelo de impresión no covalente.

Impresión covalente

En este modelo la molécula molde se enlaza al monómero funcional por medio de enlaces covalentes. Una vez formado el polímero, se rompe el enlace covalente y se elimina la molécula molde, tal como se muestra en la Figura 5.

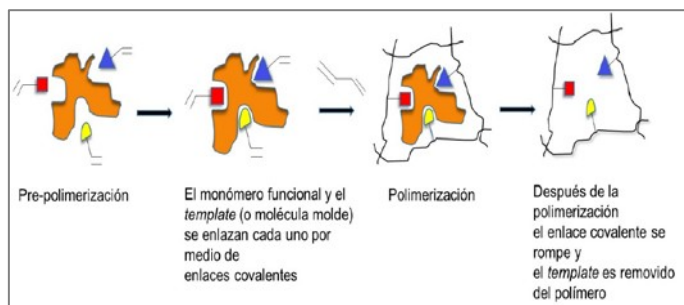


Figura 5. Modelo de impresión covalente

Los enlaces posteriores del analito al polímero impreso son los mismos enlaces covalentes. Entre las ventajas de este tipo de impresión se encuentra que los conjugados monómero-*template* son estables, se puede controlar la estequiometría de la reacción, y debido a la estabilidad de los conjugados formados por enlaces covalentes, pueden emplearse en una amplia variedad de condiciones de polimerización tales como alta temperatura, alto o bajo pH, y disolventes altamente polares. Mientras que entre las desventajas se encuentra lo difícil de la síntesis del conjugado monómero-*template*, la limitación del número de enlaces covalentes reversibles disponibles, la dificultad de extracción del analito que en ocasiones requiere condiciones severas que pueden afectar la estructura del polímero, y el lento enlazamiento entre el analito y el polímero y su posterior extracción, ya que están involucrados la formación y ruptura de enlaces covalentes.

Impresión no covalente

En este modelo, para conectar un monómero funcional con un *template*, se utilizan interacciones no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y formación de enlaces de coordinación. De esta forma el agregado puede obtenerse *in situ* simplemente por adición de los componentes a la mezcla de reacción. Después de la polimerización, se elimina la molécula molde

extrayéndola del polímero con el solvente apropiado. Los enlaces posteriores del analito con el polímero ocurren mediante interacciones no covalentes.

En la Figura 6, se muestra el modelo de impresión no covalente.

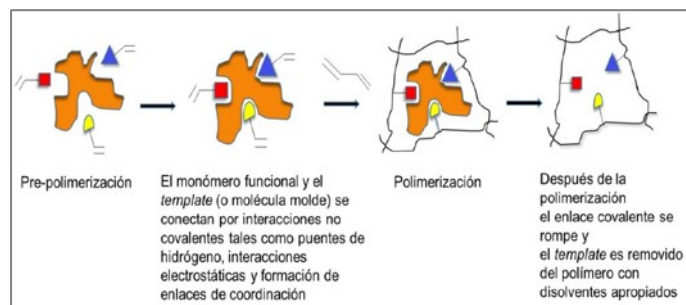


Figura 6. Modelo de impresión no covalente

Las ventajas del modelo no-covalente es que no se necesita sintetizar un conjugado covalente monómero-*template*. Este molde es eliminado fácilmente del polímero bajo condiciones suaves debido a que las interacciones no covalentes son enlaces débiles. Así mismo, ocurre un rápido enlazamiento entre el analito y el polímero y su posterior extracción. Por otra parte, entre sus desventajas se encuentra que las condiciones de polimerización deben ser escogidas cuidadosamente para maximizar la formación del agregado no covalente en las mezclas, y que la existencia de un gran exceso de monómeros funcionales (para desplazar el equilibrio y formar un agregado) frecuentemente proporciona sitios de enlazamiento no específicos, disminuyendo la selectividad del enlazamiento.

En general la impresión no covalente es más fácil de lograr y es aplicable a un amplio espectro de moléculas molde, sin embargo, la impresión covalente es usualmente superior. La elección de uno de los dos métodos depende de la necesidad y situaciones de operación, tales como el tipo de compuesto a imprimir, la selectividad requerida del mismo, el coste y el tiempo requerido para la preparación.

Mecanismo de la polimerización

El inicio del proceso de polimerización es mediante radicales libres, los cuales pueden inducirse térmica o fotoquímicamente, dependiendo de la molécula que se esté usando como molde; si la molécula es fotosensible se inducirá el proceso térmicamente, si la molécula es termosensible, se hará utilizando una fuente de radiación ultravioleta, y si la molécula fuera foto y termosensible habría que recurrir al empleo de materiales del tipo sol-gel, cuya polimerización se inicie mediante catálisis ácida o básica, y no requiera iniciación por radicales libres [39]

En el caso del 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN), la formación de radicales libres por calor o luz ultravioleta se presenta en la Figura 7.

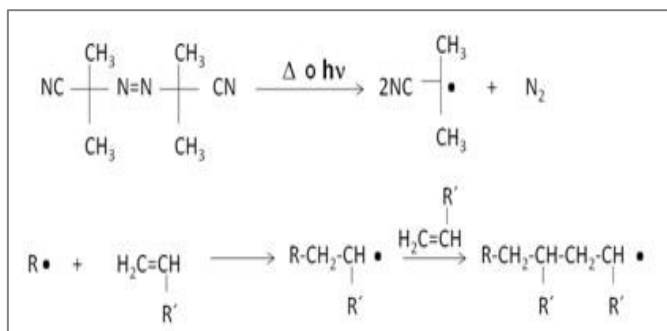


Figura 7. Descomposición del iniciador en radicales libres del 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN)

El primer paso en este mecanismo, es la ruptura homolítica del iniciador, debida al calor o a la radiación ultravioleta dando lugar a dos radicales isobutironitrilo; posteriormente estos radicales reaccionan con los monómeros funcionales y el entrecruzante.

En la Figura 8 se presentan los diversos pasos del mecanismo de polimerización por radicales libres: iniciación, propagación y terminación [40]

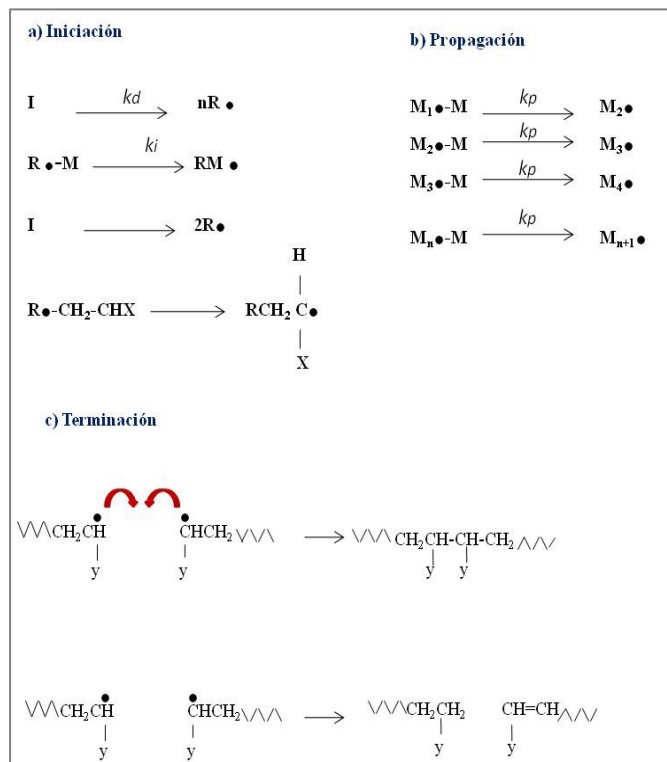


Figura 8. Pasos del mecanismo de polimerización por radicales libres

En el paso de la iniciación, está involucrada la creación del centro activo del radical libre y normalmente tiene lugar en dos pasos. El primero es la formación de radicales libres a partir del iniciador y el segundo es la adición de uno de estos radicales libres a una molécula del monómero.

Donde I representa el iniciador, R• al radical libre formado en la descomposición del primero, M el monómero y, k_d y k_i las constantes de descomposición del iniciador y de iniciación respectivamente.

Los radicales se pueden generar mediante la descomposición térmica o fotoquímica de sustancias como peróxido de benzoílo (PB), azobisisobutironitrilo (AIBN), peróxido de benzoílo [41], ozonatos de alquenos [42], ion ferroso en conjunto con peróxido de hidrógeno [43], peróxido de hidrógeno en conjunto con hidrocloreuro de hidroxilamina [44], peróxido de hidrógeno [45, 46, 47]. En la propagación, se van añadiendo moléculas de monómero al monómero radical formado en la etapa de la iniciación y la cadena va creciendo. La constante de propagación se denomina K_p . En la etapa de terminación, finaliza el crecimiento de la

cadena del polímero. Los dos mecanismos más comunes que tienen lugar implican la reacción bimolecular de las cadenas crecientes del polímero. En la combinación se produce el acoplamiento de dos cadenas crecientes para formar una sola molécula de polímero, y alternativamente un átomo de hidrógeno puede ser abstraído de una cadena creciente por otro en una reacción conocida como desproporción, formándose dos tipos de moléculas, una con un extremo saturado y la otra con un extremo insaturado; en este caso las cadenas tienen moléculas con fragmentos iniciadores solamente en un extremo, mientras la combinación da como resultado moléculas con fragmentos iniciadores en ambos extremos.

En general ocurren ambos tipos de reacciones de terminación pero en diferentes magnitudes, dependiendo del monómero y de las condiciones de polimerización.

El oxígeno es un agente interferente en la reacción de polimerización, y para evitar su presencia y la terminación prematura de la reacción, ocasionada por el oxígeno disuelto en el sistema, se efectúa la purga de la mezcla de polimerización con nitrógeno, helio o argón.

c. Aplicaciones de los Polímeros de Impronta Molecular

La tecnología de impresión molecular supone un instrumento revolucionario en el campo del análisis químico, ambiental, farmacológico y de la salud dado que los MIPs son versátiles, económicos, robustos, resistentes, estables a elevadas presiones y temperaturas, químicamente inertes a los ácidos y bases, iones metálicos y disolventes orgánicos, y poseen propiedades de reconocimiento selectivo.

Actualmente se han preparado MIPs específicos para proteínas, derivados de aminoácidos, azúcares y otros derivados, vitaminas, bases nucleótidas, y con relación a otros contaminantes ambientales, pesticidas y productos farmacéuticos como por ejemplo la teofilina, la morfina, diclofenac, ciprofloxacina, ibuprofeno diazepam, naproxeno, cortisol, pentamidina, butilparabenos.

Los MIPs han sido usados inicialmente como fase estacionaria en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Recientemente, sin embargo, también han sido utilizados en cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*), en ensayos de enlazamiento heterogéneo y en sensores de afinidad biomiméticos.

Los polímeros de impronta molecular tienen la habilidad de reconocer las moléculas molde específicamente y han sido usados en diversas aplicaciones basadas en el reconocimiento molecular, tales como sensores y biosensores, catálisis, separación cromatográfica, imitadores de anticuerpos artificiales y extracción en fase sólida, teniendo una de las aplicaciones de mayor interés industrial, la separación de materiales. A continuación se dará una breve reseña de estas aplicaciones y se hará énfasis en su uso como pre-concentradores de muestras.

Uso como sensores

Los MIPs han sido utilizados en el desarrollo de distintos sensores selectivos para la determinación de compuestos de interés medioambiental, como pueden ser pesticidas y otros contaminantes, y de interés clínico o bioquímico, como pueden ser los fármacos.

Se integran los MIPs en los sensores por polimerización *in situ*, utilizando iniciación fotoquímica o térmica, o insertándolo en una superficie llevando a cabo una iniciación química o por luz UV. Este último sistema permite modificar la superficie de un electrodo con láminas muy finas de polímeros específicos. También puede realizarse una electropolimerización sobre la superficie de una plataforma de transducción [48]

En muestras de aguas y suelos, un sensor electroquímico de pasta de carbono al que incorporaron un polímero de impronta molecular para el reconocimiento selectivo de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) fue puesto a punto por *Alizadeh y colaboradores* [49]. También en muestras de agua *Des Azevedo y colaboradores* [50] determinaron residuos de β -estradiol utilizando un electrodo de oro sobre el que depositaron una capa de polímero impreso molecularmente; para su

síntesis se usó como monómero funcional el N-feniletilen diamina metacrilamida (NPEDMA). Para la determinación de fenol en aguas de bebida, naturales y residuales, se desarrolló un sensor biomimético colorimétrico basado en membranas de polímero impreso molecularmente [51].

Se han desarrollado sensores para la determinación de residuos de antibióticos en alimentos, tales como antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas en agua y leche, en concentraciones inferiores a los LMRs establecidos por la Unión Europea para estas sustancias, utilizando un sensor fluorimétrico basado en un MIP; para la obtención del polímero se utiliza enrofloxacin como molécula molde; el sistema permite la determinación de ésta y de otras fluoroquinolonas, distinguiéndolas de otras familias de antibióticos. No se observan interferencias de otras sustancias. El procedimiento resulta sencillo y práctico, puesto que sólo requiere la precipitación previa de las proteínas cuando se trata de muestras de leche [52]

Otra familia de antibióticos para la que se han propuesto sensores basados en un MIP es la de las tetraciclinas, habiéndose aplicado satisfactoriamente a su determinación en muestras complejas como leche y miel [53, 54]

Otro antibiótico, el cloranfenicol, puede determinarse en leche, haciendo uso de un sensor electroquímico de pasta de carbono modificado con un MIP [49].

Uso como catalizadores

En los procesos bioquímicos, las enzimas se enlazan selectivamente estabilizando el estado de transición de una reacción determinada. La limitación de su aplicación radica en la baja estabilidad en disolventes orgánicos así como las limitaciones de trabajo a temperaturas o valores extremos de pH, por tal motivo en la actualidad se está en la búsqueda de sustancias sintéticas que imiten su comportamiento, y los polímeros de impronta molecular por su alta selectividad y resistencia son adecuados para emplearse en condiciones de altas temperaturas, pH extremos y con diferentes disolventes orgánicos.

Señalan *Mirata y Resmini* [55] que se han utilizado polímeros de impronta molecular como

catalizadores en diversas reacciones químicas imitando a las enzimas, utilizando como molécula molde un análogo estructural del estado de transición o del intermedio de una reacción química, mostrando un efecto catalítico análogo al de las enzimas.

Se han utilizado polímeros de impronta molecular como catalizador en la reacción de *Huisgen* de cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos [56], en la oxidación del 2,4,6-triclorofenol (TCP) [57, 58] y en reacciones de cicloadición de *Diels-Alder* [59, 60]

Como dispensadores de medicamentos

En los últimos años se han enfocado los esfuerzos de la investigación a la utilización de los MIPs como dispensadores de medicamentos de forma controlada [61] señalándose que un dispensador de medicamentos eficiente es aquel que asegura que el medicamento está en el lugar correcto, en la dosis correcta y durante el tiempo correcto. Pueden emplearse MIPs con esta finalidad dado que son resistentes a los ataques químicos, enzimáticos y al estrés mecánico que puede existir en los fluidos biológicos, pero es necesario que estos polímeros sean hidrofílicos y compatibles con los sistemas biológicos. Indican *Sellergren y Allender* [62] que este tipo de polímeros presenta inconvenientes debido a la debilidad de los enlaces de hidrógeno y a las interacciones electrostáticas en el agua, lo que provoca una disminución de la selectividad del MIP por el analito.

Gracias a su capacidad de unirse al fármaco de interés, los MIPs se han utilizado como excipientes en la administración controlada de diferentes sustancias [63]. Se han utilizado como dispensador de nicotina por vía transdérmica [64] y en la terapia contra la diabetes [65] pues se desarrolló un MIP que responde al azúcar con insulina enlazada basado en ácido fenilborónico, que es un receptor molecular de sacáridos.

En separaciones cromatográficas

La principal aplicación de los polímeros de impronta molecular es como fase estacionaria por ejemplo en cromatografía de afinidad o en

Extracción en Fase Sólida (SPE por sus siglas en inglés *Solid Phase Extraction*) [66]

Se ha observado que, cuando se utilizan MIPs como relleno de las columnas en HPLC, se obtienen picos anchos y con cola, lo cual limita su aplicación comercial. Esto se ha atribuido a la heterogeneidad de los sitios enlazantes del MIP [67]. Para solventar este inconveniente se ha preparado un polímero directamente en el interior de las columnas de acero inoxidable o las columnas capilares [68].

Como adsorbentes en extracción en fase sólida

Una de las principales aplicaciones de los polímeros de impronta molecular, posiblemente sea su empleo como fase estacionaria para la adsorción, pre-concentración y purificación de compuestos en SPE, en procedimientos tanto *on-line* como *off-line*. En una revisión bibliográfica efectuada por Pichon y Chapuis-Hugon [69] sobre la aplicación de los MIPs en la determinación de contaminantes ambientales empleando diferentes técnicas, se hace un énfasis especial en las posibilidades que tiene el empleo de los polímeros de impronta molecular como adsorbentes en los procesos de extracción en fase sólida para la extracción selectiva de los analitos de muestras complejas. Esta técnica de extracción en fase sólida, basada en polímeros de impronta molecular se denomina MISPE (por sus siglas en inglés *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*).

El análisis de un determinado compuesto en mezclas complejas frecuentemente requiere diversos pasos de pretratamiento. Si el analito está presente en baja concentración, es necesario que éste sea concentrado para poderlo detectar por técnicas analíticas estándares. Además, si se trata de una muestra compleja de compuestos similares, es necesario un paso que involucre la limpieza de la misma.

La extracción en fase sólida es una técnica ampliamente utilizada para el pre-tratamiento de muestras, pues ésta es flexible y fácil de automatizar. Con ella pueden prevenirse muchos problemas asociados con la extracción líquido-líquido, tales como separación incompleta de fases, recuperaciones no cuantitativas, uso de equipos costosos y grandes cantidades de disolventes

orgánicos. Consiste en percolar un volumen conocido a través de un adsorbente sólido empaquetado en un cartucho, columna o disco, bajo condiciones cuidadosamente controladas que favorecen la absorción preferencial del analito sobre los componentes de la matriz. El analito es luego recuperado del adsorbente, extrayéndolo en un pequeño volumen de una mezcla de disolventes apropiada [34]

En la Figura 9 se presenta el procedimiento de extracción en fase sólida.

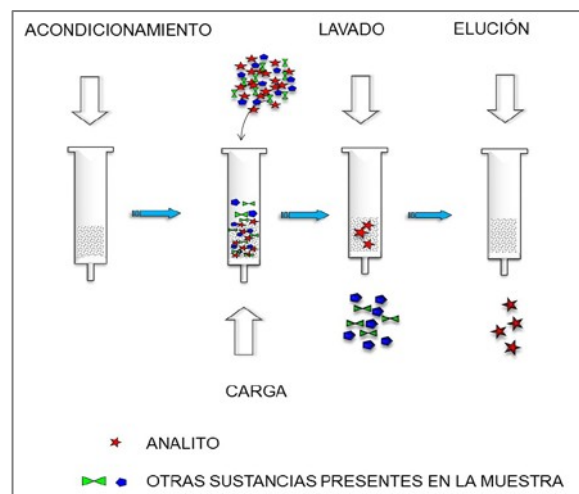


Figura 9. Procedimiento de extracción en fase sólida

Los MIPs pueden utilizarse directamente como columnas de extracción o como cartuchos y se combinan con los diferentes instrumentos de análisis; su alta afinidad y selectividad se traduce en menores límites de detección, tiempos de análisis más cortos e instrumentación más económica, lo que conduce a un uso más amplio de ellos.

Los pasos involucrados en el desarrollo de un nuevo protocolo de extracción en fase sólida basado en polímeros de impronta molecular son los siguientes: síntesis del material, ensayos para sus propiedades de reconocimiento, el desarrollo de un protocolo de extracción y la validación de este protocolo.

El uso de polímeros de impronta molecular combinados con la técnica de extracción en fase sólida permite el uso de protocolos tanto en ensayos fuera de línea como en protocolos automatizados acoplados a instrumentos analíticos.

La posibilidad de utilizar los MIPs para la extracción en fase sólida se ha evaluado para

diversas sustancias, como por ejemplo el tamoxifeno [70], el fenuron o el isoproturon [71].

En el caso de muestras conteniendo antibióticos, se han efectuado diferentes estudios, por ejemplo *Zhang y colaboradores* [72], desarrollaron un método rápido y selectivo utilizando el campo magnético de polímeros impresos molecularmente (MMIP) como adsorbente para la extracción de antibióticos β -lactámicos a partir de muestras de leche. El MMIP fue preparado con la penicilina V potásica como molécula plantilla, ácido metacrílico, como monómero funcional, dimetacrilato de etileno como agente de reticulación y Fe_3O_4 como componente magnético. Los resultados experimentales mostraron que el MMIP presentaba una gran afinidad y selectividad hacia la penicilina V potásica y otros antibióticos β -lactámicos estructuralmente relacionados. *Kowalski y colaboradores* [73], desarrollaron un método en el cual el cloranfenicol puede ser eficientemente pre-concentrado en un sistema de inyección en flujo a través de un reactor empaquetado con polímeros de impronta molecular, y la determinación se hizo en HPLC con detección UV; en condiciones óptimas el límite de detección para la muestra de 100 mL con pre-concentración en línea fue de $0,66 \text{ mg L}^{-1}$. *Rodríguez y colaboradores* [74] describieron un método simple basado en la extracción con polímeros de impronta molecular y extracción en fase sólida (MISPE) combinada con cromatografía líquida con detección por fluorescencia (LC-FLD) para la determinación de residuos de fluoroquinolonas (FQ) en alimentos para bebés. El método implica la extracción de la muestra con una solución de ácido *o*-fosfórico (50 mM, pH 3,0) / ACN (20:80, v/v) y la limpieza de la muestra mediante la carga de los extractos en cartuchos de MIP. En condiciones óptimas del MISPE se obtuvieron recuperaciones de FQ en el rango de 92 a 106 %, con RSD menores del 8 %. La validación del método se realizó de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE, en términos de linealidad, exactitud, precisión, selectividad, límite de decisión (cca) y capacidad de detección (β cc). El método propuesto se aplicó con éxito para el análisis de alimentos infantiles de diferentes composiciones adquiridos en supermercados y farmacias locales. Los resultados no mostraron presencia de

cantidades residuales de FQ en las muestras analizadas por encima de los límites de decisión del método (cca entre $5 - 151 \mu\text{g Kg}^{-1}$). *Van Royen y colaboradores* [75] desarrollaron y evaluaron un polímero de impronta molecular para la detección y limpieza de bencil-penicilina en leche. Se comparó la unión específica de la bencil-penicilina al MIP con la unión no específica, utilizando un polímero no impreso (NIP). Validaron con éxito el método empleando extractos de leche enriquecida con bencil-penicilina. Cuando emplearon disoluciones del analito en acetonitrilo, las recuperaciones utilizando MISPE se encontraron entre 90-95 % mientras que con acetonitrilo fueron de 70-80 %. El LOD y el LOQ para la aplicación MISPE en muestras de leche fueron de $0,51$ y $1,02 \text{ mg Kg}^{-1}$, respectivamente. Por otra parte, *Urraca y colaboradores* [76] describieron la síntesis de polímeros de impronta molecular para la extracción selectiva (MISPE) de seis antibióticos del grupo de las FQ (enrofloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina, danofloxacina, sarafloxacina y norfloxacina), a partir de muestras de músculo de pollo y su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con fluorescencia (FLD) o detección de espectrometría de masas (MS). El MIP preparado usando enoxacina como molécula molde, una mezcla de ácidos metacrílico y ácido trifluorometacrílico como monómeros funcionales y etilenglicoldimetacrilato como el monómero entrecruzante, mostró las mejores propiedades de reconocimiento a las FQ que los otros polímeros estudiados. Las partículas esféricas del MIP se prepararon utilizando perlas de sílice como soporte. Los polímeros se empaquetaron en cartuchos de extracción en fase sólida, de forma que el método MISPE-HPLC optimizado permitió la extracción de los antibióticos a partir de muestras acuosas seguido de un lavado selectivo con acetonitrilo/agua (0,005 % de TFA, pH 3,0), 20:80 (v/v). La elución se llevó a cabo con ácido trifluoroacético (5 %) en metanol. Las condiciones óptimas del MISPE condujeron recuperaciones de las FQ en muestras de músculo de pollo que oscilaron entre 68-102 % y las precisiones en el orden de 3-4% (RSD, $n = 18$). El método fue validado de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE, en términos de linealidad, exactitud, precisión,

selectividad, límite de decisión ($cc\alpha$) y la capacidad de detección (βcc) por HPLC - FLD y HPLC - MS/MS. Los límites de detección mejoraron en el análisis por HPLC -MS/MS y oscilaron entre 0,2-2,7 $\mu g K g^{-1}$ ($S/N = 3$) para todas las FQs probadas.

Un ejemplo del empleo de un proceso MISPE en muestras medioambientales es la determinación de compuestos fenólicos en agua. Se optimiza la síntesis del polímero utilizando tres disolventes, cloroformo, acetonitrilo y tolueno; como disolvente de lavado se usa diclorometano y como eluyente acetonitrilo con un 5% de disolución de amoniaco [77]. También se han determinado sulfonamidas en aguas de río y embalses utilizando una microextracción en fase sólida con un MIP [78].

Scorrano y colaboradores [79] sintetizaron un MIP de una forma sencilla con ácido metacrílico como monómero y una mezcla de acetonitrilo y agua como porogen, para utilizarlo como adsorbente en SPE para la extracción, pre-concentración y eliminación de interferencias de 1-metiladenosina (MA), nucleósido modificado que se utiliza como marcador tumoral en orina.

Como pre-concentradores de la muestra

En general, la metodología empleada en el análisis de muestras en las cuales se requiere el análisis de residuos comprende diversas etapas que incluyen la extracción del analito o analitos de la muestra, una etapa de limpieza o *clean-up* para eliminar una parte importante de los interferentes, y si es necesario, la concentración del extracto obtenido para el análisis y finalmente, la detección sensible y selectiva del analito o analitos de interés.

La preparación de la muestra puede ser la etapa más laboriosa de un método, y se utilizan diferentes estrategias para extraer los residuos y realizar el *clean-up* de la muestra, siendo las técnicas más empleadas la extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, dispersión de matriz en fase sólida, el método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*), entre otros.

Li y Gong [80] prepararon un polímero de impronta molecular altamente selectivo para el 17 β -estradiol usando una técnica de impresión no covalente. Los polímeros MIP se sintetizaron en etanol usando 17 β -estradiol como molde, 3-

aminopropiltriétoxilano como monómero funcional y ácido clorhídrico como catalizador, mostrando una excelente afinidad y eficacia de adsorción. Los resultados de la prueba mostraron que el MIP exhibía una afinidad de unión significativa hacia la molécula molde empleando extracción en fase sólida acoplada con cromatografía líquida de alta resolución (SPE-HPLC), sugiriendo que el polímero MIP puede ser empleado para eliminar los compuestos 17 β -estradiol de aguas contaminadas.

En una revisión efectuada por Pacheco-Silva y colaboradores [81] de trabajos publicados en los últimos años de análisis de residuos de medicamentos veterinarios en muestras de leche, huevos y otras matrices, señalan que el método de extracción más empleado es la extracción líquido-líquido utilizando acetonitrilo como disolvente, seguido de una etapa de *clean-up* con extracción en fase sólida para permitir la cuantificación de residuos, generalmente, por cromatografía.

La tecnología de impresión de iones es una de las herramientas más prometedoras en ciencias de separación y purificación debido a su alta selectividad, buena estabilidad, simplicidad y bajo costo [82]. Se ha utilizado principalmente para la eliminación selectiva, pre-concentración, detección y pocos campos diversos. Los autores efectuaron una revisión bibliográfica y evaluaron diferentes parámetros incluyendo agente acomplejante y de lixiviación, pH, coeficiente de selectividad relativa, límite de detección y capacidad de adsorción. Las aplicaciones biomédicas en las cuales se puede emplear esta tecnología incluyen principalmente la extracción selectiva de metales tóxicos de plasma sanguíneo humano y muestras de orina. El tratamiento de aguas residuales implica la eliminación selectiva de iones metálicos altamente tóxicos como Hg (II), Pb (II), Cd (II), As (V), etc. La pre-concentración cubre la recuperación de iones metálicos económicamente importantes como oro, plata, platino y paladio. También incluye la pre-concentración selectiva de lantánidos y actínidos.

Indica Martín-Esteban [83], que a pesar del enorme desarrollo de la instrumentación analítica, la mejora de la selectividad durante la extracción y/o posterior limpieza de extractos de muestra en el análisis

ambiental es un área de intensa actividad de investigación. A este respecto, la incorporación de polímeros con impresión molecular (MIPs) en la preparación de muestras aparece como una de las alternativas más versátiles y prometedoras. Los MIP son polímeros estables hechos a medida con capacidades de reconocimiento molecular, proporcionados por la presencia de una plantilla durante su síntesis y por lo tanto son materiales excelentes para proporcionar selectividad a la preparación de la muestra. En la revisión efectuada por el autor, se presenta el uso de MIPs en la preparación de muestras para el análisis ambiental, incluyendo su uso ya bien establecido en la extracción en fase sólida, así como su reciente incorporación a otras técnicas de extracción tales como microextracción en fase sólida.

Hasta la fecha, se han utilizado con éxito distintos tipos de adsorbentes para la pre-concentración de compuestos orgánicos, pero la mayoría de los adsorbentes utilizados no son selectivos reteniendo simultáneamente otros compuestos presentes en la muestra.

Por todo ello, se siguen desarrollando sistemas de tratamiento de muestra, alternativos a los métodos clásicos ya existentes, para la determinación de residuos, como son los basados en el empleo de polímeros de impresión o impronta molecular, capaces de preconcentrar de forma selectiva los analitos, a la vez que proporcionan una limpieza de la muestra.

d. Línea de Investigación en el Centro de Investigación y Desarrollo de Ingeniería de la Universidad Católica Andrés Bello

Los antibióticos son sustancias que tienen actividad antimicrobiana y pueden ser producidos por microorganismos o sintetizados. Son empleados, tanto en animales como humanos, para el tratamiento de diversas enfermedades y sus residuos se encuentran tanto en alimentos como en el ambiente dado que pueden pasar a los suelos y a los cuerpos de agua en concentraciones de $\mu\text{g Kg}^{-1}$, ocurriendo la contaminación de los mismos.

Señala la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en el 2017 [84], que el uso incorrecto de los antibióticos en animales

podría tener como consecuencia que se desarrollen bacterias conocidas con el nombre de superbacterias las cuales son resistentes a los antimicrobianos. Estas pueden transmitirse a aquellas personas que tienen contacto habitual con animales o podrían estar presentes en carnes sin la cocción adecuada. Asimismo, los fertilizantes o aguas que contengan heces de animales pueden transmitir a los cultivos y alimentos, bacterias resistentes a los antimicrobianos.

La resistencia a los antimicrobianos (RAM), es un fenómeno natural que se produce cuando microorganismos, tales como bacterias, virus, hongos y parásitos, se adaptan a los agentes antimicrobianos dando como resultado que los fármacos se vuelvan ineficaces para su tratamiento. En Asia, esta problemática se viene presentando desde hace algunos años, pues se descargan a los cuerpos de agua una gran cantidad de antibióticos fabricados por las compañías farmacéuticas y éstos luego son consumidos tanto por humanos como por animales, ocurriendo el fenómeno anteriormente mencionado.

Es por ello que se hace indispensable poder detectar y cuantificar los antibióticos que están presentes tanto en los alimentos como en el ambiente, en muy bajas concentraciones.

Diversas técnicas analíticas son utilizadas para la detección y cuantificación de antibióticos, y éstas deben ser de alta sensibilidad y especificidad. Entre ellas se encuentra la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección en el Ultravioleta (HPLC-UV).

Para muestras complejas no basta con concentrar la muestra, pues es necesario un paso previo de limpieza o *clean up* de la misma, es por ello que se necesita un adsorbente que sea capaz de retener el analito en forma selectiva. En este sentido, los Polímeros de Impronta Molecular se emplean en conjunto con la Extracción en Fase Sólida (MISPE) para el pretratamiento y concentración de la muestra.

En estudios previos realizados para la determinación del antibiótico eritromicina (ERY), perteneciente a la familia de los macrólidos, en muestras de leche de oveja [85], se emplearon

polímeros de impronta molecular como fase adsorbente de un proceso convencional de extracción en fase sólida. Inicialmente se llevó a cabo la síntesis de varios polímeros de impronta molecular específicos para este antibiótico utilizando diferentes condiciones de síntesis y posteriormente, mediante la caracterización estructural y pruebas de fijación/elución, se seleccionó el polímero más efectivo para ser utilizado en un proceso de extracción en fase sólida, de forma selectiva hacia el analito de interés, la eritromicina. Tras obtener las condiciones óptimas de fijación y elución, se desarrolló el método para la determinación de eritromicina en muestras de leche de oveja. Dada la complejidad de la matriz de la muestra seleccionada, fue necesario llevar a cabo un paso previo de desproteinización de la misma. Se llevó a cabo un estudio de interferencias, en el que se estudió la especificidad del MIP considerado como óptimo frente a otros antibióticos de la misma familia de los macrólidos y estructuralmente similares, tales como: tilosina, espiramicina, josamicina, roxitromicina e ivermectina. Los resultados obtenidos revelaron que el polímero utilizado presenta una gran especificidad hacia la eritromicina, puesto que las recuperaciones obtenidas para el resto de los compuestos estudiados fueron menores del 35 %, en todos los casos. El método completo desarrollado fue validado empleando muestras de leche de oveja libre de antibióticos suplementada, en términos de exactitud, precisión, linealidad, y límite de cuantificación. Se obtuvieron recuperaciones mayores del 95 % a tres niveles de concentración, con valores de desviación estándar menores del 2 %. Los estudios de repetibilidad y reproducibilidad ofrecieron recuperaciones comprendidas entre 91,2-99,7 %, con desviaciones estándar menores del 5 %, en todos los casos. El método desarrollado fue lineal en el intervalo 24 - 965 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. El límite de cuantificación obtenido fue de 24,1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, por debajo del límite máximo de residuos de ERY establecido por la legislación (40 $\mu\text{g Kg}^{-1}$).

Para determinar antibióticos β -lactámicos en leche de vaca, se prepararon polímeros de impronta molecular (MIP) con ampicilina (AMP) y, se evaluó la viabilidad de estos materiales para su utilización como adsorbente de extracción en fase sólida para

la pre-concentración selectiva y determinación de AMP en muestras de leche de vaca [86]. Los MIPs se sintetizaron por polimerización en masa usando ácido metacrílico o metacrilato de metilo como monómero funcional y dimetacrilato de etilenglicol como entrecruzante en diferentes relaciones. La caracterización de los MIPs se realizó por Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR). Se optimizaron las variables que afectan al procedimiento de extracción en fase sólida con impresión molecular (MISPE) y las recuperaciones de AMP fueron superiores al 98%, y la Desviación Estándar Relativa fue inferior al 7%. Se alcanzó un factor de pre-concentración de 20, que fue suficiente para determinar la AMP en los niveles permitidos por la Unión Europea (4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) en la leche de vaca. La selectividad del AMP-MIP se evaluó en presencia de otros antibióticos β -lactámicos estructuralmente relacionados (amoxicilina, oxacilina, penicilina G)

Continuando con el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de antibióticos a baja concentración mediante HPLC-UV, se desarrolló y estandarizó un método para determinar AMP en soluciones a baja concentración utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección en el Ultravioleta (HPLC-UV) [87]. El Límite de Detección (LOD) fue de 24,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ y el Límite de Cuantificación (LOQ) fue igual a 86,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, alcanzándose un valor de pre-concentración de la muestra de 50. Con esta pre-concentración de la muestra, se pudo determinar ampicilina a una concentración de hasta 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ con un porcentaje de recuperación mayor a 94%. El coeficiente de determinación obtenido (R^2) fue de 0,998 y el coeficiente de correlación, R, fue de 0,99, demostrando una correlación lineal en el rango de trabajo.

Actualmente se está empleando el polímero de reconocimiento de AMP para determinar a este analito en muestras de aguas del Lago de Valencia [88] y en muestras de suelos [89].

Por otra parte se están sintetizando polímeros de impronta molecular para el reconocimiento de amoxicilina (AMOX), perteneciente a la familia de los β -lactámicos [90] y amikacina (AMK), perteneciente a la familia de los aminoglucósidos

[91]. Con estos trabajos se busca desarrollar polímeros de impronta molecular que sean capaces de reconocer a antibióticos y desarrollar métodos de análisis para estos contaminantes por HPLC-UV.

IV. CONCLUSIONES

A pesar de la existencia de un gran número de aplicaciones como adsorbentes para la extracción en fase sólida, se continúa investigando y desarrollando materiales que contribuyan a las técnicas de extracción de muestras que sean automatizadas, rápidas, sencillas y selectivas, dentro de las cuales se encuentran los Polímeros de Impronta Molecular.

Los métodos para el tratamiento de la muestra empleando MISPE-contaminante, son rápidos y selectivos para la determinación del analito en bajos niveles de concentración, lo que supone una alternativa que ofrece ventajas frente a los métodos convencionales de tratamiento de muestra para matrices complejas.

La presencia de contaminantes a bajos niveles de concentración (ng/L) y el análisis de matrices complejas, necesita la síntesis de materiales altamente selectivos para la extracción en fase sólida, entre los que se encuentran los Polímeros de Impronta Molecular.

El desarrollo y aplicación de los polímeros de impronta molecular ha venido incrementándose, desde mediados del siglo pasado hasta nuestros días, por la versatilidad en la formación de sitios de unión específicos para analitos de diversas fuentes. Una de las aplicaciones más relevantes es su uso como preconcentradores de muestras cuando el analito se encuentra en muy bajas concentraciones, permitiendo su detección y análisis en muestras ambientales, de alimentos y medicinales.

La investigación actual en el Centro de Investigación y Desarrollo de Ingeniería (CIDI) empleando Polímeros de Impronta Molecular combinados con la Extracción en Fase Sólida para la limpieza y pre-concentración de muestras conteniendo antibióticos en muy bajas concentraciones, permitirá continuar con el desarrollo de métodos analíticos para la detección y determinación de contaminantes en concentraciones traza.

REFERENCIAS

- [1] Society for Molecular Imprinting. Disponible en http://mipdatabase.com/all_items.php
- [2] Piletsky, S. A. y Turner, A. P. F. (2002). Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Electroanalysis*, **14**, 5: 317–323
- [3] Polyakov, M.V. (1931). Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhur. Fiz. Kim.* 2 799-805
- [4] Polyakov, M V, Kuleshina, L, Neimark, I. (1937). On the dependence of silica gel adsorption properties on the character of its porosity. *Zhurnal Fizieskoj Khimii/Akademiya. SSSR* 10, 100-112
- [5] Dickey, F.H., (1949). The Preparation of Specific Adsorbents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA*, 35, 227-9.
- [6] Dickey, F.H., (1955). Specific Adsorption. *J. Phys. Chem.*, 59 695.
- [7] Mosbach, K., Mosbach, R. (1966). Entrapment of Enzymes and Microorganisms in Synthetic Cross-linked Polymers and their Application in Column Techniques. *Acta Chem. Scan.* 20: 2807-2810.
- [8] Takagishi, T y Klotz, I. (1972). Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. *Biopolymers*. 11 (2) 483-491.
- [9] Wulff, G y Sarhan, A. (1972). The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angewandte Chemie International Edition*, 11, (4), 341-341
- [10] Nishide, H., Tsuchida, E. (1976). Selective adsorption of metal ions on poly (4-vinylpyridine) resins in which the ligand chain is immobilized by crosslinking. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry And Physics*. 177, (8), 2295-2310.
- [11] Shea KJ, Thompson EA. (1978). Template synthesis of macromolecules. Selective functionalization of an organic polymer. *Journal of Organic Chemistry*. 43. (21). 4253-4255.
- [12] Belokon YN, Tararov VI, Saveleva TF, Vitt SV, Bakhmutov VI, Belikov VM. (1980). Mechanical stabilization of molecular-conformation by entrapping in a polymer matrix. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics*. 81. (1). 89-104.
- [13] Damen J y Neckers D. 1980. Memory of synthesized vinyl polymers for their origins. *Journal of Organic Chemistry*. 45 (8) 1382-1387.
- [14] Kato, M., Nishide, H., Tsuchida, E., Sasaki, T. (1981). Complexation of metal-ion with poly(1-vinylimidazole) resin prepared by radiation-induced polymerization with template metal-ion *Journal of Polymer Science, Polymer Chemistry Edition* 19, (7), 1803-1809.
- [15] Gupta S, Neckers, D. (1982). Template effects in chelating polymers. *Journal of Polymer Science, Polymer Chemistry Editin* 20 (6) 1609-1622.
- [16] Shirai M, Tanaka M. (1985). Cation binding-properties of polyesters with photodimerizable groups and oxyethylene

- units - Effect of photo-cross-linking with template cations. *European Polymer Journal* 21 (12) 999-1003.
- [17] Kuchen, W., Schram, J. (1988). Metal-ion-selective exchange resins by matrix imprint with methacrylates. *Angewandte Chemie International Edition* 27, (12), 1695-1697.
- [18] Inoue K, Baba Y, Yoshizuka K, Noguchi H, Yoshizaki M. (1988). Selectivity series in the adsorption of metal-ions on a resin prepared by crosslinking copper (II)-complexed chitosan. *Chemistry Letters* 17 (8) 1281-1284.
- [19] Efendiev, A., Amanov, E, Orudzhev, D, Kabanov, V. (1988). 4-Vinylpyridine-based complexing polymer sorbents oriented towards the copper-ion sorption *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 300, (6), 1393-1395.
- [20] Efendiev, A., Kabanov, V. (1982). Selective polymer complexons prearranged for metal-ions sorption *Pure and Applied Chemistry* 54, (11), 2077-2092.
- [21] Sarhan, A., Abou-El-Zahab, M. (1987). Racemic-resolution of mandelic-acid on polymers with chiral cavities. 2. Enzyme-analog stereospecific conversion of configuration. *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications* 8, (11), 555-561.
- [22] Sarhan, A., Wulff, G. (1982). On polymers with enzyme-analogous structure .14. Stereospecific binding by amide bonding or electrostatic interaction. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* 183 (7) 1603-1614.
- [23] Wulff, G., Poll, H., Minarik, M. (1986). Enzyme-analog built polymers .19. Racemic-resolution on polymers containing chiral cavities. *Journal of Liquid Chromatography* 9, (2-3), 385-405.
- [24] Wulff, G., Vietmeier, J., Poll, H. (1987). Enzyme-analog built polymers .22. Influence of the nature of the cross-linking agent on the performance of imprinted polymers in racemic-resolution. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* 188 (4) 731-740.
- [25] Wulff G, Poll HG. (1987). Enzyme-analog built polymers .23. Influence of the structure of the binding-sites on the selectivity for racemic-resolution. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* 188 (4) 741-748.
- [26] Andersson, L., Sellergren, B., Mosbach, K. (1984). Imprinting of amino-acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Letters* 25 (45) 5211-5214.
- [27] Fujii, Y., Kikuchi K, Matsutani, K., Ota, K., Adachi, M., Syoji, M, Haneishi, I., Kuwana, Y. (1984). Template synthesis of polymer schiff-base cobalt (III) Complex and formation of specific cavity for chiral amino-acid. *Chemistry Letters* 13(9)1487-1490.
- [28] Wulff, G., Best, W., Akelah, A. (1984). Enzyme-analog built polymers, 17. Investigations on the racemic resolution of amino acids. *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents* 2 (2)167-174.
- [29] Andersson, L., Ekberg, B., Mosbach, K. (1985). Synthesis of a new amino-acid based cross-linker for preparation of substrate selective acrylic polymers. *Tetrahedron Letters* 26 (30) 3623-3624.
- [30] Sellergren, B., Ekberg B, Mosbach, K. (1985). Molecular imprinting of amino-acid derivatives in macroporous polymers - demonstration of substrate-selectivity and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino-acid derivatives. *Journal of Chromatography* 347 (1) 1-10.
- [31] Wulff, G. (1995). Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 34. 1812-1832.
- [32] Gilart, N Borrull, F., Fontanals, N y Marcé, R. (2014). Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 1, e 8-e 18.
- [33] Rachkov, A., Minoura, N. (2001). Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1544, 1-2, 255-266.
- [34] Sellergren, B., *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in analytical Chemistry*, Elsevier, Ámsterdam, 2001, Capitulo 5
- [35] Yan, H., Row, K. (2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *Int J. Mol. Sci.* 7: 155-178
- [36] Lanza, F., Hall, A.J., Sellergren, B., Bereczki, A., Horvai, G., Bayouhd, S., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C. (2001). Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine. *Anal Chim Acta*, 435 91-106.
- [37] Van Nostrum, C. (2005). Molecular imprinting: A new tool for drug innovation. *Drug Discovery. Today: Technologies*. 2,1: 119-124.
- [38] Komiya M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H. *Molecular imprinting: From fundamentals to applications*. Wiley-Vch. Alemania, 2003.
- [39] Fernández-González, A., Guardia, L., (2007). Reconocimiento molecular mediante materiales biomiméticos: impresión molecular. *An. Quím.* 103 (2) 14-22.
- [40] López, F. *Fundamentos de Polímeros*. VI Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química, Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Venezuela. 2004.
- [41] Barson, C., Bevington, J., Flint, N. (1999). Further study of 1, 4-diphenylbuta-1, 3-diene as an additive during the radical polymerization of methyl methacrylate. *European Polymer Journal*. 35 (11): 1935-1938
- [42] Cunliffe, D., Lockley, J., Ebdon, J., Rimmer, S., Palasz, P., Emmett, S. (2001). Emulsion polymerization of methyl methacrylate initiated by alkene ozonates. *Polymer*. 42 (23): 9329-9333
- [43] Poornanandhan. A., Rajalingam. P., Radhakrishnan. G. (1993). Polymer-supported redox catalysts for polymerization. *Polymer*. 34 (7) : 1485-1489

- [44] Kay, T., Rodríguez, F. (1983). Polymerization of acrylamide using the hydrogen peroxide-hydroxylamine couple. *Journal of Applied Polymer Science*. 28 (2): 633 - 646
- [45] Mir Mohamad Sadeghi, G., Morshedian, J., Barikani, M. (2003). The effect of initiator-to-monomer ratio on the properties of the polybutadiene-ol synthesized by free radical solution polymerization of 1, 3-butadiene. *Polymer international*. 52 (7): 1083-1087
- [46] Singh, A., Ma, D., Kaplan, D. (2000). Enzyme-Mediated Free Radical Polymerization of Styrene. *Biomacromolecules*. 1 (4): 592 -596
- [47] Uma Sankar Nandi, Santi R. Palit. (1955). Hydrogen peroxide as initiator in vinyl polymerization in homogeneous system. I. Kinetic studies. *Journal of Polymer Science*. 17 (83): 65-78.
- [48] Vasapollo, G., Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G., Review. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *Int. J. Mol. Sci*. 12 (9) 5908-5945.
- [49] Alizadeh, T., Ganjali, M.R., Zare, M., Norouzi, P. (2012). Selective determination of chloramphenicol at trace level in milk samples by the electrode modified with molecularly imprinted polymer. *Food Chem*. 130 (4) 1108-1114.
- [50] Des Azevedo, S., Lakshmi, D., Chianella, I., Whitcombe, M.J., Karim, K., Ivanova-Mitseva, P.K., Subrahmanyam, S., Piletsky, A., (2013). Molecularly imprinted polymer – hybrid electrochemical sensor for the detection of b-estradiol. *Ind. Eng. Chem. Res*. 52 (39) 13917-13923.
- [51] Sergeeva, T., Chelyadina, D., Gorbach, L., Brovko, O., Piletska, E., Piletsky, S., Sergeeva, L. y El'skaya, A., (2014). Colorimetric biomimetic sensor systems based on molecularly imprinted polymer membranes for highly-selective detection of phenol in environmental samples. *Biopolym. Cell*. 30 (3) 209- 215.
- [52] Ton, X., Acha, V., Haupt, K., Sum Bui, B., (2012). Direct fluorimetric sensing of UV- excited analytes in biological and environmental samples using molecularly imprinted polymer nanoparticles and fluorescence polarization. *Biosens. Bioelectron*. 36 (1) 22-28.
- [53] Wang, L., Lin, F., Yu, L., (2012). A molecularly imprinted photonic polymer sensor with high selectivity for tetracyclines analysis in food. *Analyst*, 1373502-3509.
- [54] Bougrini, M., Florea, A., Cristea, C., Sandulescu, R., Vocanson, F., Errachid, A., Bouchikhi, B., El Bari, N., Jaffrezic-Renault, N., (2016). Development of a novel sensitive molecularly imprinted polymer sensor based on electropolymerization of a microporous-metal-organic framework for tetracycline detection in honey. *Food Control*, 59 424-429.
- [55] Mirata, F. y Resmini, M. Molecularly imprinted polymers for catalysis and synthesis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 150, Chapter: Molecularly imprinted polymers in Biotechnology, (2015) 107-129.
- [56] Zhang, H., Piacham, T., Drew, M., Patek, M., Mosbach, K., Ye, L., (2006). Molecularly imprinted nanoreactors for regioselective Huisgen 1, 3-dipolar cycloaddition reaction. *J. Am. Chem. Soc*. 128 (13) 4178-4179.
- [57] Díaz-Díaz, G., Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco, P., (2012). Hemo-acrylic polymers as catalyst for the oxidative dehalogenation of 2,4,6-trichlorophenol. Chloroperoxidase's mimic imprinting effects. *J. Mol. Catal. A: Chem*. 353-354 117-121.
- [58] Díaz-Díaz, G., Diñeiro, Y., Menéndez, M.I., Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco, P., (2011). Molecularly imprinted catalytic polymers with biomimetic chloroperoxidase activity. *Polym*. 52 (12) 2468- 2473.
- [59] Kirsch, N., Hedin-Dahlström, J., Henschel, H., Whitcombe, M.J., Wikman, S., Nicholls, I.A., (2009). Molecularly imprinted polymer catalysis of a Diels-Alder reaction. *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 58 (1-4) 110-117.
- [60] Henschel, H., Kirsch, N., Hedin-Dahlström, J., Whitcombe, M.J., Wikman, S., Nicholls, I.A., (2011). Effect of the cross-linker on the general performance and temperature dependent behaviour of a molecularly imprinted polymer catalyst of a Diels-Alder reaction. *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 72 199-205.
- [61] Chien, Y. y Lin, S., (2002). Optimisation of treatment by applying programmable rate- controlled drug delivery technology. *Clin. Pharmacokin*. 41 1267-1299.
- [62] Sellergren, B. y Allender, C., (2005). Molecularly imprinted polymers: a bridge to advanced drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 57 1733-1741.
- [63] Allender, C., Richardson, C., Woodhouse, B., Heard, C.M., Brain, K.R., (2000). Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers. *Int. J. Pharm*. 195 (1-2): 39-43.
- [64] Morais Ruela, A., Costa Figueiredo, E., Ribeiro Pereira, G., (2014). Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems. *Chem. Eng. J*. 248 1-8.
- [65] Guo, B., Pan, G., Guo, Q., Zhu, C., Cui, W., Li, B., Yang, H., (2015). Saccharides and temperature dual-responsive hydrogel layers for harvesting cell sheets. *Chem. Commun*. 51 644-647.
- [66] Wei, S., Mizaikoff, B., (2007). Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations. *J. Sep. Sci*. 30 1794-1805.
- [67] Lee, W., Cheng, C., Pan, H., Chung, T. y Hwang, C., (2008). Chromatographic characterization of molecularly imprinted polymers. *Anal. Bioanal. Chem*. 390: 1101-1109.
- [68] Yin, J., Yang, G., Chen, Y., (2005). Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its L-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A* 1090 68-75.
- [69] Pichon, V., Chapuis-Hugon, F. (2008). Review: Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants. *Anal. Chim. Acta* 622. 48-61.

- [70] Rashid, B. A., Briggs, R., Hay, J., Stevenson, D. (1997) Preliminary evaluation of a Molecularly imprinted polymer for solid-phase extraction of tamoxifen. *Analytical Communications*. 34. 303-305.
- [71] Martín-Esteban, A., Turiel, E., Stevenson, D. (2001). Effect of template size on the selectivity of molecularly imprinted polymers for phenylurea herbicides. *Chromatographia*. 53 (1): S434-S437.
- [72] Zhang, X., Chen, L., Xu, Y., Wang, H., Zeng, Q., Zhao, Q., Ren, N., Ding, L. (2010). Determination of β -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 12/2010; 878 (32): 3421-6.
- [73] Kowalski, D., Poboży, E., y Trojanowicz, M. (2011). Flow-Injection Preconcentration of Chloramphenicol Using Molecularly Imprinted Polymer for HPLC Determination in Environmental Samples. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*. 2011, 143416 doi:10.1155/2011/143416
- [74] Rodríguez, E, Moreno-Bondi, M., Marazuela, M. (2011). Multiresidue determination of fluoroquinolone antimicrobials in baby foods by liquid chromatography. *Food Chemistry*. 127 (3): 1354 - 1360
- [75] Van Royen, G., Dubruel, P y Daeseleire, E. (2014). Development and evaluation of a molecularly imprinted polymer for the detection and *clean-up* of benzylpenicillin in milk. *Journal of agricultural and food Chemistry*. 62 (35): 8814 - 8821.
- [76] Urraca, J; Castellari, M; Barrios, C; Moreno-Bondi, M. (2014). Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1343: 1-9.
- [77] Peipei, Q., Jincheng, W, Jing, J., Fan, S., Jiping, C., (2010). 2,4-dimethylphenol imprinted polymers as a solid-phase extraction sorbent for class-selective extraction of phenolic compounds from environmental water. *Talanta* 81 1630-1635.
- [78] Díaz-Álvarez, M., Barahona, F., Turiel, E., Martín-Esteban, A., (2014). Supported liquid membrane-protected molecularly imprinted beads for micro-solid phase extraction of sulfonamides in environmental waters. *J. Chromatogr. A* 1357 158-164.
- [79] Scorrano, S, Longo, L., Vasapollo, G., (2010). Molecularly imprinted polymer for solid- phase extraction of 1 methyladenosine from human urine. *Anal. Chim. Acta* 659 167-171.
- [80] Li H, Li X y Gong G. (2009). Removal of 17 β -estradiol pollutants from contaminated water by molecularly imprinted polymers. *Proceedings of 2009 International Conference on Energy and Environment Technology, ICEET*. 3, 683-686
- [81] Pacheco-Silva, E., Rodrigues de Souza, J y Dutra Caldas, E. (2014). Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. *Quim. Nova*, 37 1: 111-122
- [82]] Hande P, Samui A, Kulkarni P. (2015). Highly selective monitoring of metals by using ion-imprinted polymers. *Environmental Science and Pollution Research*. 22, 10, 7275-7404.
- [83] Martín-Esteban A, (2016). Recent molecularly imprinted polymer-based sample preparation techniques in environmental analysis. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 9: 8-14.
- [84] FAO (2017). Resistencia a los Antimicrobianos (RAM). Abordando el uso de Antimicrobianos en el Sector Pecuario <http://www.fao.org/3/b-i6386s.pdf>
- [85] García-Mayor, M., Paniagua-González, G., Soledad-Rodríguez, B., Garcinuño-Martínez, R., Fernández-Hernando, P., Durand-Alegría, J. (2015). Ocurrence of erythromycin residues in sheep milk. Validation of an analytical method. *Food and Chemical Toxicology* 78: 26-32
- [86] Soledad-Rodríguez, B., Fernández-Hernando, P, Garcinuño-Martínez, R., Durand-Alegría, J (2017). Effective determination of ampicillin in cow milk using a molecularly imprinted polymer as sorbent for sample preconcentration. *Food Chemistry*. 224, 1:432-438
- [87] Contreras, A y Soledad-Rodríguez, B. (2017). Estandarización de un método analítico para determinar ampicilina como contaminante en bajas concentraciones en muestras acusas por HPLC-UV. *Rev Tekhné* 20 (1):001-006
- [88] Sarmiento, D. (2017). Desarrollo de un método analítico para la detección y cuantificación de ampicilina en las aguas del Lago de Valencia utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección en el Ultravioleta (HPLC-UV) combinada con la Extracción en Fase Sólida-Polímero de Impronta Molecular (MISPE). Proyecto de Trabajo de grado. Universidad Católica Andrés Bello. Tutora Soledad-Rodríguez, B
- [89] Tineo, D. (2017). Determinación de ampicilina en suelos del hato Corralito utilizando la técnica de HPLC combinada con la Extracción en Fase Sólida con Polímeros de Impronta Molecular. Proyecto de Trabajo de grado. Universidad Católica Andrés Bello. Tutora Soledad-Rodríguez, B
- [90] Afanador, Y. (2017). Desarrollo de un Polímero de Impronta Molecular para la amoxicilina y de un método analítico para su determinación utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) combinada con la Extracción en Fase Sólida con Polímeros de Impronta Molecular (MISPE). Proyecto de Trabajo de grado. Universidad Católica Andrés Bello. Tutora Soledad-Rodríguez, B
- [91] Suarez, G. (2017). Desarrollo de un Polímero de Impronta Molecular para la amikacina y de un método analítico para su determinación utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) combinada con la Extracción en Fase Sólida con Polímeros de Impronta Molecular (MISPE). Proyecto de Trabajo de grado. Universidad Católica Andrés Bello. Tutora Soledad-Rodríguez, B