



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Reconocimiento específico de análogos de
tricotecenos con polímeros de impronta molecular**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C O

PRESENTA

ANTONIO REINA TAPIA



MÉXICO, D.F

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Profesor: SILVIA ELENA CASTILLO BLUM
Vocal	Profesor: JESÚS GRACIA MORA
Secretario	Profesor: ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ
1er Suplente	Profesor: CLAUDIA PAOLA GÓMEZ TAGLE CHÁVEZ
2do Suplente	Profesor: JORGE LUIS LÓPEZ ZEPEDA

Sitio dónde se desarrolló el trabajo de investigación

Laboratorio 100
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear
Unidad de Estudios de Posgrado
Facultad de Química
UNAM



Dr. Jesús Gracia Mora
Asesor

Antonio Reina Tapia
Sustentante

Abreviaturas

Polímero de impronta molecular	MIP
Polímero sin impronta molecular	NIP
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación	Sagarpa
Food and Drug Administration	FDA
Aleucia tóxica alimentaria	ATA
Ácido desoxirribonucleico	ADN o DNA
Ácido ribonucleico	ARN o RNA
Desoxinivalenol	DON
Zearalenona	ZON
Etilenglicoldimetacrilato	EGDMA
Pentaeritritol	PETA
Tetraetilenglicoldiacrilato	TEGDA
Cromatografía de gases	CG o GC
Detector de ionización de llama	FID
Detector de conductividad térmica	TCD
Ácido metacrílico	MAA
Producto interno bruto	PIB
Fase móvil	FM
Fase estacionaria	FE

Espectroscopía de infrarrojo	IR
Espectroscopía de ultravioleta	UV
Azobisisobutironitrilo	AIBN
Polímero de impronta con EGDMA y el análogo CH4	MIP CH4 EGDMA
Polímero de impronta con EGDMA, zinc y el análogo CH4	MIP CH4 Zn EGDMA
Polímero de impronta con PETA y el análogo CH4	MIP CH4 PETA
Polímero de impronta con EGDMA y el análogo CC89	MIP CC89 EGDMA
Polímero de impronta con EGDMA, zinc y el análogo CC89	MIP CC89 Zn EGDMA
Polímero de impronta con PETA y el análogo CC89	MIP CC89 PETA
N-piridin-2-il-N-(4-vinilbenzil)piridin-2-amina	Nvb-dpa

Índice

I. RESUMEN	8
II. INTRODUCCIÓN.....	10
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS.....	15
1. OBJETIVOS GENERALES.....	15
2. OBJETIVOS PARTICULARES	15
V. ANTECEDENTES	16
A. EL MAÍZ Y LAS MICOTOXINAS.....	16
1. <i>El maíz en México</i>	16
a) Introducción.....	16
b) Producción actual en México.....	17
2. <i>Las micotoxinas</i>	18
a) Introducción.....	18
b) Efectos en la salud	19
c) Tipos de micotoxinas.....	21
3. <i>La vomitoxina en el maíz</i>	23
4. <i>Detección y separación de micotoxinas</i>	24
B. LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR Y LAS MICOTOXINAS	26
1. <i>Los polímeros de impronta molecular (MIP)</i>	26
a) Historia	26
b) Fundamentos de los MIP.....	27
c) MIP covalentes y no covalentes	29
d) Factores que afectan un MIP.....	31
2. <i>Las micotoxinas y los polímeros de impronta molecular</i>	33
3. <i>MIP y desoxinivalenol</i>	34
a) Análogos de micotoxinas.....	34
b) Trabajos relacionados	35
C. COMPUESTOS DE COORDINACIÓN Y MIP	36

1. Compuestos de coordinación con zinc	36
2. Complejos de impronta molecular	37
D. CARACTERIZACIÓN	39
1. Cromatografía de gases	39
a) Fundamentos de cromatografía.....	39
b) Parámetros cromatográficos.....	41
c) Instrumentación	41
d) Elección del método	43
2. Isotermas de adsorción	44
VI. PARTE EXPERIMENTAL	55
A. PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO	55
B. PREPARACIÓN DE LOS POLÍMEROS.....	55
1. Polímero sin impronta molecular (NIP).....	56
2. Análogo CH ₄	57
3. Análogo CC89.....	59
C. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN.....	62
D. LIGANTE NVB-DPA	64
E. REFERENCIAS.....	65
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
A. POLÍMEROS NO COVALENTES.....	66
1. NIP EGDMA	66
2. MIP EGDMA CH ₄	68
3. MIP PETA CH ₄	69
B. POLÍMEROS COVALENTES.....	71
1. MIP Zn CH ₄ EGDMA.....	71
2. MIP Zn CC89.....	77
C. ISOTERMAS DE ENLACE	80
1. Análogo CH ₄	80
2. Análogo CC89	92
3. Resumen	102

4. Prueba de especificidad	104
D. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ADSORCIÓN DE VOMITOXINA (DON) POR EL POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR MIP CH4 PETA	106
E. LIGANTE NVB-DPA	108
VIII. CONCLUSIÓN	113

I. Resumen

Las micotoxinas, y en particular los tricotecenos de fórmula general $C_{15}H_{23}O_2$, son sustancias tóxicas generadas por hongos filamentosos que provocan el desperdicio de una gran cantidad de granos de maíz y trigo ya que una vez contaminados no se ha logrado retirar estas sustancias de manera eficiente. Los riesgos para la salud al consumir estas sustancias son altos y ocurren a partir de concentraciones de micotoxina muy bajas.

Los polímeros de impronta molecular (MIP) son compuestos capaces de adsorber específicamente un compuesto en una mezcla compleja. Al utilizar metales de transición en la preparación de estos polímeros la eficiencia de adsorción aumenta considerablemente. El principio de acción de estos polímeros es simple, en analogía con las enzimas, estos compuestos tienen un sitio de reconocimiento que es específico a una cierta molécula y por ende son capaces de adsorberla. Existen tres tipos de MIP en función de las interacciones que ocurren en el sitio activo: covalentes, no covalentes y complejos de impronta. Pese a que los estudios de MIP han sido extensos a lo largo de la historia, todavía no se han desarrollado aplicaciones directas importantes.

El grupo de trabajo tiene experiencia en la preparación de MIP y se ha logrado retirar sustancias dañinas de otros sistemas. El uso de la ivermectina en las vacunas del ganado, por ejemplo, contamina el medio ambiente provocando la muerte de la microfauna una vez escretada. Los MIP otorgan una solución sencilla, barata y amigable con el medio ambiente para evitar el daño provocado por esta sustancia.

Los resultados alentadores y la experiencia acumulada a través de los años han motivado el diseño de nuevos polímeros de impronta molecular y en este caso, utilizando análogos de tricotecenos como plantilla en el proceso de formación del polímero, se espera solucionar la problemática presentada.

En el presente trabajo se realizó un extenso estudio de los polímeros de impronta molecular, utilizando los análogos de micotoxina CC89 y CH4 como moldes, y evaluando el efecto en la variación de los entrecruzadores (EGDMA y PETA), disolventes (metanol, cloroformo y agua) y tipo de interacción molecular en el sitio de reconocimiento del polímero. Para evaluar la eficiencia en la adsorción de los análogos de micotoxina, se realizó un seguimiento del cambio en la concentración por cromatografía de gases, y se obtuvo una isoterma de adsorción. Después del trabajo experimental se concluyó que los polímeros de impronta son capaces de retirar hasta 72% del análogo con el polímero de impronta MIP CC89 Zn EGDMA en cloroformo y 21% de la micotoxina real con el polímero MIP CH4 PETA en agua. Estos resultados permitirían una remoción cuantitativa, 99%, en cuatro extracciones sucesivas para el análogo.

II. Introducción

Desde hace aproximadamente 7000 años, en el valle de Tehuacán, se empezaron a cultivar y cosechar granos de maíz. La importancia del maíz en el desarrollo prehispánico, colonial y moderno del país es inconmensurable. Una enormidad de ritos y costumbres de nuestra civilización giran alrededor del uso y aprovechamiento del maíz y del cultivo de las milpas. Hoy en día, el maíz es el principal cultivo de México, en 2010 se produjeron más de 23 millones de toneladas con un valor comercial de 65 mil millones de pesos en casi 8 millones de hectáreas de cultivo, según publicó oficialmente Sagarpa (acrónimo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).¹

Las milpas y cultivos de maíz suelen ser cultivos de temporal, es decir que no hay riego sino que se encuentran en zonas en las que las precipitaciones son suficientemente importantes como para que proliferen los granos. La humedad ambiental en los cultivos aunada a las inapropiadas condiciones de almacenamiento, humedad no mayor a 14.5%, facilita la proliferación de hongos y mohos.² Algunos de estos hongos y mohos secretan sustancias tóxicas para los consumidores del grano: las micotoxinas. La contaminación de los granos de maíz genera una gran cantidad de desperdicios y por lo tanto una pérdida económica considerable. México no está exento de dicha contaminación, de hecho al ser el cuarto productor mundial de maíz el efecto negativo de estas pérdidas es mucho mayor.³ En 1984, la Organización de Agricultura y Alimentos de las Naciones Unidas, encontró que por lo menos una cuarta parte de las reservas mundiales de granos estaban contaminadas por micotoxinas.⁴

Las micotoxinas son sustancias tóxicas de diversos orígenes biológicos. En el maíz se puede encontrar una gran variedad: aflatoxinas, tricotecenos, ocratoxinas, etc. Las micotoxinas provocan efectos adversos en los organismos desde concentraciones muy bajas, la dosis máxima permitida en humanos y animales es de 200ng/g en niños y 1750ng/g en adultos.^{5,6} La vomitoxina es un compuesto neurotóxico e inmunotóxico a partir de dicho umbral de concentraciones. Provoca la inhibición de las síntesis proteicas y por ende la inhibición de las síntesis de ADN y

ARN y produce trastornos neurológicos que derivan en enfermedades como la anorexia.⁶

Este trabajo se ha enfocado al estudio de la familia de los tricotecenos y particularmente a la vomitoxina o desoxinivalenol (DON). Los tricotecenos son sesquiterpenos con fórmula general $C_{15}H_{23}O_2$. La vomitoxina particularmente es un tricoteceno tipo B producido por los hongos filamentosos de la especie *Fusarium*, concretamente *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*, que proliferan en los granos de maíz y de trigo debido a la humedad ambiental.⁷

Por lo general la caracterización y detección de las micotoxinas se lleva a cabo por cromatografía de gases, técnica analítica de separación de compuestos, aunque es común que se utilice cromatografía de líquidos, espectroscopía de IR, UV, fluorescencia y biosensores.⁸⁻¹¹ Sin embargo, la separación de micotoxinas en mezclas complejas está lejos de ser un problema resuelto, se han buscado distintos métodos de separación pero ninguno ha resultado ser lo suficientemente selectivo como para retirar únicamente la toxina.

Por otra parte, desde la segunda mitad del siglo XX se ha comenzado a trabajar en materiales de impronta, esto quiere decir materiales que tienen una estructura y afinidad con algún objeto de interés en específico. Las enzimas, por ejemplo son materiales de impronta naturales y las cerraduras son materiales de impronta artificiales, cada una tiene un objeto al cual es específica, en un caso el sustrato y en el otro la llave. Esto dio origen a la síntesis de muchos diferentes materiales de impronta, entre ellos los primeros polímeros de impronta molecular (MIP por sus siglas en inglés, Molecularly Imprinted Polymers), que consisten en polímeros con huecos cuyas interacciones y estructura son específicas a una molécula llamada plantilla. Estos MIP son capaces de adsorber la plantilla en una mezcla compleja y por lo tanto separarla y retirarla de la misma.¹²

Se ha trabajado con muchos polímeros de impronta distintos, entre ellos algunos cuyas plantillas son ocratoxinas o aflatoxinas, pero están enfocados a la detección y no a la separación de las micotoxinas. No hay de momento ningún trabajo que

plantee como objetivo la remoción de vomitoxina.¹³⁻¹⁶ Considerando que la vomitoxina es una molécula de interés en una mezcla muy compleja, los polímeros de impronta molecular ofrecen una solución para su separación eficiente y efectiva. Sin embargo, la alta toxicidad de las micotoxinas dificulta severamente el trabajo, por lo tanto se ha optado por realizar los MIP con análogos de desoxinivalenol.¹⁷ Estos análogos son moléculas con grupos funcionales idénticos o parecidos a la molécula real y de tamaño semejante. En particular, la molécula de DON tiene una parte polar y una parte no polar, por ello se ha decidido sintetizar dos análogos, uno semejante a la parte polar y otro a la no polar, esto permite también evaluar qué parte de la molécula puede tener interacciones más fuertes con el polímero y por lo tanto favorecer esas interacciones mediante el disolvente que se escoja.

El trabajo que se presenta a continuación plantea sintetizar polímeros de impronta molecular con base en análogos de desoxinivalenol capaces de retirar dicha molécula de manera eficiente, haciendo un seguimiento cuantitativo, por cromatografía de gases, de la adsorción de los polímeros sintetizados.

(1) SIAP, Sagarpa, Maíz: números esenciales de un cultivo fundamental, Boletín de 2011, Mexico City, (2011), www.siap.gob.mx. Visitado el 8 de septiembre de 2013 a las 17:45.

(2) Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, Diario Oficial de la Federación: México, D.F., (2009); Vol. NOM-247-SSA1-2008.

(3) Atanda, S. A.; Pessu, P. O.; Agoda, S.; Isong, I. U.; Adekalu, O. A.; Echendu, M. A.; Falade, T. C. *African Journal of Microbiology Research* (2011), vol.5, p.4373.

(4) FAO, Deposito de documentos de la FAO, Micotoxinas de importancia mundial, Rome, (2001), www.fao.org/docrep Visitado el 8 de septiembre de 2013, a las 17:45.

(5) Duarte-Vogel, S.; Villamil-Jiménez, L. C. *Micotoxinas en la Salud Pública* (2006), vol.8, p.129.

- (6) Reddy, K. R. N.; Salleh, B.; Saad, B.; Abbas, H. K.; Abel, C. A.; Shier, W. T. *Toxin Reviews* **(2010)**, vol.29, p.3.
- (7) Foroud, N. A.; Eudes, F. *International Journal of Molecular Sciences* **(2009)**, vol.10, p.147.
- (8) Krska, R.; Welzig, E., Mycotoxin analysis: An overview of classical, rapid and emerging techniques; 1st ed., Editorial: Wageningen Academic Publishers: **(2006)**, p 225.
- (9) Pascale, M.; De Girolamo, A.; Visconti, A.; Magan, N.; Chianella, I.; Pietska, E. V.; Piletsky, S. A. Use of itatonic acid-based polymers for solid-phase extraction of desoxynivalenol and application to pasta analysis, *Analytica Chimica Acta* **(2008)**, vol.609, p.131.
- (10) Pittet, A. *Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.* **(2005)**, vol.96, p.424.
- (11) Vidal, J. C.; Bonel, L.; Ezquerro, A.; Hernández, S.; Bertolín, J. R.; Cubel, C.; Castillo, J. R. *Biosensors and Bioelectronics* **(2013)**, vol.49, p.146.
- (12) Sellergren, B. *Molecular Imprinted Polymers*; Elsevier Science: Amsterdam, **(2001)**; vol.23.
- (13) Appell, M.; Maragos, C. M.; Kendra, D. F. *ACS Symp. Ser.* **(2008)**, 1001, 152.
- (14) Mausia, T.; De, S. D.; Qu, G.; Van, P. C.; Zhang, D.; Wu, A.; De, S. S. *Anal. Lett.* **(2011)**, vol.44, p.2633.
- (15) Sergeyeva, T. A.; Piletska, O. V.; Brovko, O. O.; Goncharova, L. A.; Piletsky, S. A.; El'ska, G. V. *Ukrain'skyi Biokhimichniy Zhurnal* **(2007)**, vol.79, p.109.
- (16) Urraca, J. L.; Marazuela, M. D.; Merino, E. R.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C. *Journal of Chromatography A* **(2006)**, vol.1116, p.127.
- (17) Appell, M.; Maragos, C. M.; Kendra, D. F.; *American Chemical Society: Food Contaminants*, **(2008)**, vol.1001, p.152.

III. Hipótesis

Los polímeros de impronta molecular tanto no covalentes como los formados con un centro de reconocimiento molecular de zinc y con la plantilla del análogo de micotoxina serán capaces de secuestrar la vomitoxina en una muestra de grano contaminado.

IV. Objetivos

1. Objetivos generales

Sintetizar polímeros de impronta molecular y evaluar su reconocimiento específico con análogos de tricotecenos y con desoxinivalenol.

2. Objetivos particulares

Sintetizar polímeros de impronta molecular variando plantilla, entrecruzador y naturaleza covalente o no covalente del polímero.

Evaluar la capacidad de estos polímeros para la adsorción de análogos de tricotecenos y desoxinivalenol, y proponer condiciones óptimas de adsorción.

Evaluar la especificidad en el reconocimiento de los polímeros en condiciones óptimas de adsorción.

V. Antecedentes

A. El maíz y las micotoxinas

1. El maíz en México

a) Introducción

El maíz es uno de los granos de consumo más antiguos que se conocen. Este cereal, *Zea mays*, pertenece a la familia de las Gramíneas (Poáceas) y a la tribu Maydeas. Su origen se centra en América, donde desde hace más de 7000 años, en el Valle de Tehuacán, Puebla, ya se cultivaban los primeros granos de maíz. Existen distintos géneros de Maydeas alrededor del mundo, por ejemplo *Coix* en el sureste asiático es el único género oriental de relevancia por su uso como grano forrajero, sin embargo *Zea mays* es la única especie cultivada relevante en el aspecto económico.¹⁸

Desde la antigüedad el hombre y el maíz han convivido y evolucionado de la mano. La planta del maíz es doméstica y no crece en forma salvaje por lo que depende completamente de los cuidados del hombre.^{19,20} El gran desarrollo que ha tenido el maíz se debe en parte a su gran productividad, su tasa de multiplicación es de 1:1000, tiene el mayor potencial para la producción de carbohidratos por unidad de superficie por día, posee una gran facilidad para sufrir modificaciones formando híbridos y tiene una alta actividad fotosintética.²¹ En la actualidad, el maíz es la punta de lanza del desarrollo tecnológico en tanto que transgénesis.

Hoy, el maíz ocupa la segunda plaza en producción mundial, tras el trigo y por delante del arroz, y es el cereal con mayor rendimiento de grano por hectárea. Posee la cualidad de adaptarse fácilmente a un sinfín de ambientes, pese a originarse en los trópicos ahora se cultiva en Canadá y Rusia, al norte, y en

Argentina, al sur del continente americano. Puede cultivarse a nivel del mar, por debajo del mismo e incluso en alta montaña, a 3800 msnm en la cordillera de los Andes.

Todo esto ayuda a que el maíz sea un cultivo de gran importancia económica en el mundo, ya sea como alimento humano, para ganado o para ser transformado en productos industriales. La producción anual en 1999 ya era de 580 millones de toneladas métricas cultivadas en más de 140 millones de hectáreas.²²

Particularmente en México, zona tropical americana en donde se originó el maíz, este cereal tiene una importancia histórica, cultural y económica muy fuerte. Desde la época prehispánica, las civilizaciones que se asentaron en el territorio mexicano cultivaron y aprovecharon el maíz, para consumo directo de la mazorca o para preparar la harina que dio origen a las tortillas, entre otros usos. No se puede entender la historia de los pueblos indígenas, ni la actualidad de México sin considerar el grano de maíz.

b) Producción actual en México

En 2009 la producción mundial de maíz, liderada por Estados Unidos y en la que México fue cuarto lugar, fue mayor de 800 millones de toneladas. En 2010, México produjo más de 23 millones de toneladas con un valor comercial superior a 65 mil millones de pesos en una superficie de cultivo de alrededor de 7 millones de hectáreas. Esto equivale a 20% del producto interno bruto (PIB) de actividades primarias del país en ese año.^{1,23} El cultivo de maíz en México se da en casi todo el territorio nacional, sin embargo cinco estados, Sinaloa, Jalisco, el Estado de México, Michoacán y Guerrero, producen más de la mitad del maíz.

En cuanto a comercio exterior, México ocupa el lugar 35 en exportación de maíz al vender más de 550 mil toneladas por más de 150 millones de dólares a Japón, Corea del Sur y China, principalmente. A pesar de ser un gran productor, México tiene un saldo negativo en la balanza comercial ya que importó ese año más de 7

millones de toneladas y gastó más de mil millones de dólares, sobre todo en maíz destinado al alimento pecuario.¹

Finalmente, el cultivo, la producción y el consumo de maíz son de gran relevancia histórica, cultural y económica en México.

2. Las micotoxinas

a) Introducción

Los hongos pertenecen al subreino Thallophyta. Se caracterizan por tener un núcleo bien definido, sin embargo carecen de clorofila, a diferencia de la mayoría de las plantas.²⁴ Son heterótrofos que se alimentan de los sustratos de plantas y animales. La gran mayoría de los hongos son patógenos y algunos crecen en plantas para el consumo humano. Atacan y destruyen productos tanto crudos como manufacturados provocando pérdidas económicas considerables.³ Algunos hongos son aprovechados por el hombre como alimento o como droga alucinógena.²⁵ Los hongos tienen una distribución global y crecen en una gran variedad de climas incluidos el desierto y el mar^{26,27} y a temperaturas extremas. Estos hongos no causan directamente pérdidas y enfermedades en animales y humanos sino que lo hacen produciendo un veneno llamado micotoxina que contamina el alimento humano y pecuario.

Anualmente se desperdicia una cantidad nada despreciable de comida debido a su contaminación por productos metabólicos tóxicos, secretados por hongos. Estos desperdicios son considerablemente más importantes en países calurosos y húmedos en donde no se tienen condiciones de almacenamiento apropiadas. Se estima que un cuarto de las reservas mundiales y de los cultivos se ven afectados por micotoxinas, lo que repercute fuertemente en la economía.²⁸ Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de los hongos y la gran mayoría pertenece a uno de estos tres géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las micotoxinas son nocivas para la salud tanto humana como animal y pueden producirse en una gran variedad de ambientes y condiciones, lo que las hace aún más temibles.²⁹

Algunas de estas micotoxinas, de las que hablaremos más adelante, como las aflatoxinas, son potentes sustancias carcinogénicas y mutagénicas, y se les asocia a la inducción de cáncer, supresión inmunológica, defectos digestivos, neurológicos y sanguíneos y otras enfermedades crónicas.³⁰

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas en los años sesenta, multitud de investigaciones se han puesto en marcha y se han hecho significativos avances en el entendimiento e identificación de estas sustancias y de los hongos que las generan. El impacto económico causado por la contaminación de granos y cultivos por micotoxinas es grande debido a que en muchas ocasiones deben ser destruidos. En Estados Unidos las pérdidas por cultivos contaminados ascienden a millones de dólares.³¹ A pesar de las regulaciones internacionales y la investigación constante, no se ha logrado frenar la contaminación masiva de alimentos ni los casos de enfermedades relacionadas. Cabe resaltar que es complicado diagnosticar correctamente una micotoxicosis debido a que los síntomas pueden confundirse fácilmente con otras enfermedades.³² Las micotoxinas tardan menos de 24 horas en ser secretadas una vez que el hongo ha proliferado y son compuestos de bajo peso molecular, sin excepción.³

b) Efectos en la salud

El poder patógeno de las micotoxinas por ingestión se estableció a partir de 1960, sin embargo desde la Edad Media hay casos documentados de intoxicación por pan contaminado con *Claviceps purpurea*.³³ Se ha demostrado, con pruebas en animales, que las micotoxinas producen efectos hepatotóxicos, neurotóxicos, mutagénicos y cancerígenos.^{34,35}

Por otra parte, el poder patogénico de las micotoxinas vía inhalación es difícil de cuantificar. El tamaño de las partículas que contienen a estas toxinas y que les permiten transportarse (esporas, polvo, etc.) determinan la profundidad de la penetración de estas sustancias al aparato respiratorio. La mayoría de ellas interfieren en numerosos pasos de la vida celular lo que las hace aún más peligrosas.³³ Por último, en cuanto al contacto directo con la piel se refiere, las

micotoxinas actúan rápidamente. Se absorben con facilidad e incluso a muy bajas dosis generan enrojecimiento e irritación importante.³⁶

En la siguiente tabla se muestran los síntomas provocados por la intoxicación con diferentes micotoxinas:

Tabla 1. Síntomas causados por algunas micotoxinas³³

Sistema	Síntoma	Micotoxina
Vascular	Hemorragia	Aflatoxina
Digestivo	Diarrea, hemorragia intestinal y necrosis del hígado	Aflatoxina
Respiratorio	Edema pulmonar, fiebre, hemorragia	Fumonisina
Nervioso	Falta de coordinación, coma	Tricotecenos, aflatoxinas
Cutáneo	Irritación, necrosis	Tricotecenos
Urinario	Disfunción renal	Ocratoxina
Genital	Esterilidad	Zearalenona, tricotecenos

Las dosis máximas permitidas de micotoxinas en alimentos están reguladas en más de 98 países, sin embargo ningún valor dosis-efecto ha sido demostrado para el hombre. Las micotoxicosis agudas no se dan muy a menudo aunque se conocen casos desde finales del siglo XIX, por ejemplo en India en 1974 se dieron 400 casos de hepatitis debidas al consumo de aflatoxinas o cada año en Indonesia donde 20,000 personas son víctimas de cáncer de hígado debido a las micotoxinas.³³ Conforme las investigaciones avanzan, se ha descubierto que las micotoxinas juegan un rol importante en el debilitamiento del sistema inmunológico, el crecimiento de diferentes tipos de cáncer y el desarrollo de diversas enfermedades, por lo que las micotoxinas deben considerarse un problema sanitario importante.

c) Tipos de micotoxinas

Existen varios tipos de micotoxinas, los principales son: aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, fumonisina y tricotecenos.

Las aflatoxinas son micotoxinas carcinogénicas producidas por algunas especies *Aspergillus* en una gran variedad de condiciones de cultivos de agricultura, principalmente por *A. flavus* en maíz y cacahuate. *A. flavus* puede proliferar con temperaturas desde 10 hasta 43°C, en climas templados, subtropicales y tropicales con lo cual el clima no es una adversidad para este hongo. Las aflatoxinas pueden producirse tanto antes como después de la cosecha.³⁷ Se identificó por primera vez en el Reino Unido en 1960 cuando llegó a Londres un barco cargado de cacahuate proveniente de Brasil y provocó la muerte de miles de pavos, patos y otros animales domésticos. A partir de entonces se encontró que la aflatoxina B₁ causaba brotes de hepatitis en humanos y animales, cáncer de hígado en animales y provocaba cáncer de hígado en humanos con hepatitis B, sobre todo en el sureste asiático y África subsahariana. La dosis máxima permitida en alimentos se encuentra en el intervalo entre 4 y 20ng/g.^{4,38} En 2004, 125 personas murieron en Kenia tras ingerir maíz con altas concentraciones de aflatoxina.³⁹ Las aflatoxinas se encuentran en frutas, nueces, queso, leche y productos fermentados principalmente.³³

Las ocratoxinas son producidas por las especies de hongos *Aspergillus* y *Penicillium*, particularmente *A. ochraceus* que prolifera en los trópicos en granos de café y cacao y *P. verrucosum* que prolifera en cereales en regiones templadas.⁴⁰ Se ha demostrado que la ocratoxina A es una nefrotoxina potente y contamina sobre todo granos de cereal almacenados.⁴¹ En general las ocratoxinas se encuentran en una gran variedad de productos entre ellos pan, pasta, cerveza, vino, jugos de frutas, nueces, frutas, café, cacao, charcutería, queso, leche, productos fermentados y repostería.³³

La zearalenona es producida principalmente por los hongos *Fusarium* y en particular *F. graminearum* en maíz, trigo y otros cereales.⁴² La zearalenona es una micotoxina estrogénica que causa problemas en los órganos reproductivos, especialmente en los cerdos. En el maíz, sobre todo en países en desarrollo, suele encontrarse zearalenona junto a desoxinivalenol.³ Además de los cereales, es común encontrar zearalenona en productos manufacturados como la cerveza y los productos de repostería.³³

Las fumonisinas son micotoxinas carcinogénicas producidas por hongos de la especie *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides*, que proliferan en el maíz. Las fumonisinas fueron identificadas por primera vez en 1988 en Sudáfrica a partir de cultivos de *Fusarium verticillioides* (o *Fusarium moniliforme*).²⁹ A principios de los años noventa, se dio un brote de fumonisina B₁ en cultivos de maíz en Estados Unidos que provocó la muerte de caballos y cerdos en todo el país.⁴³ Ese año, se desarrollaron métodos analíticos para la detección de fumonisinas en maíz.⁴⁴ Durante el año 1991, se encontró que la fumonisina B₁ causaba cáncer de hígado en ratas y esto fue ratificado por la FDA (Food and Drug Administration por sus siglas en inglés).⁴⁵ La dosis permitida de fumonisina, según la FDA, es 2-4 µg/g en maíz para consumo humano y 1-50 µg/g para forraje animal.⁴⁶

Los tricotecenos son un grupo de más de 180 sesquiterpenos con fórmula general C₁₅H₂₃O₂ producidos por hongos de la especie *Fusarium* en el maíz y otros cereales. Poseen un esqueleto tetracíclico-12,13-epoxitricotec-9-eno y de allí deriva su nombre.⁴⁷ El epóxido en los carbonos 12 y 13 es lo que hace que estas sustancias sean tan reactivas. Estos compuestos se dividen en cuatro grupos según su origen, los grupos A y B son producidos por hongos, el grupo D es producido por mohos, *Stachybotryschartarum*, y el grupo C que contiene dos grupos epóxidos.⁷

3. La vomitoxina en el maíz

Este trabajo está enfocado a la familia de los tricotecenos y particularmente a la vomitoxina o desoxinivalenol (DON). La vomitoxina (figura 1) es un tricoteceno (figura 2) tipo B producido por los hongos filamentosos de la especie *Fusarium*, concretamente *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum*, que crecen en los granos de maíz y de trigo debido a la humedad ambiental tanto en el cultivo como en el almacenamiento. El desoxinivalenol es la micotoxina más corriente de los tricotecenos y se conoce también por vomitoxina por el efecto, intensos vómitos, que causa al ganado intoxicado, sobre todo después del brote en China entre los años 1960 y 1985.⁴⁸

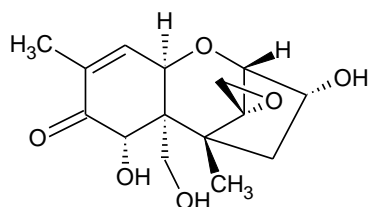


Figura 1. Estructura de la vomitoxina

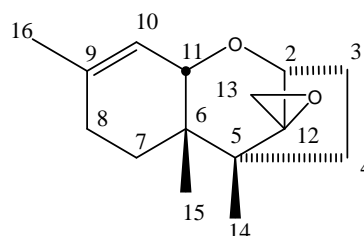


Figura 2. Esqueleto de los tricotecenos

Los límites establecidos por la FDA y la legislación de la Unión Europea para las dosis de desoxinivalenol son:

- 8 ppm para cereales
- 12 ppm para productos manufacturados con base en cereales
- Entre 5 y 10 ppm para consumo animal
- 5 ppm en comida para niños

Los cerdos son la especie más sensible a los efectos provocados por DON, mientras que las aves de corral y los rumiantes son relativamente resistentes.⁴⁹

Los estudios realizados con DON se han enfocado sobre todo al trigo en comparación con los demás granos y cereales. El maíz es el grano que tiene mayor porcentaje de pruebas positivas para DON (89%).⁴⁷ La exposición prolongada provoca aleucia tóxica alimentaria (ATA) y se presentan los siguientes

síntomas: dolor abdominal, mareo, irritación de la garganta, vómito, diarrea y coágulos.⁵⁰ La administración crónica produce pérdida de peso, anorexia, inmunosupresión y efectos neurotóxicos.

4. Detección y separación de micotoxinas

La mayoría de las micotoxinas son estables y sobreviven sin dificultades al almacenamiento y a los procesos, incluso a altas temperaturas. Hasta ahora no existen métodos de remoción eficientes y el mejor control es la prevención.⁵¹

La presencia de hongos productores de toxinas no forzosamente implica la presencia de toxinas, y de la misma manera, que no haya hongos visibles no significa que no haya micotoxinas presentes, esto es algo a tener en cuenta.

Alrededor de 90% de error en la detección se debe al muestreo.⁵²

Debido a la variedad de estructuras de las micotoxinas, no es posible utilizar un solo método de identificación. Por lo tanto, dependiendo de las propiedades físicas y químicas, se han desarrollado distintos métodos analíticos buscando que sean: robustos, sensibles, específicos, pero también altamente flexibles y reproducibles. El método más popular es la cromatografía de líquidos acoplada al espectrómetro de masas, sin embargo todos los métodos requieren un tratamiento previo de la muestra seguido de un método de separación.

○ Tratamiento previo de la muestra

El tratamiento de la muestra antes del método de detección es crucial para que el análisis sea efectivo. La extracción de la micotoxina de la matriz biológica depende de la estructura de la toxina, y se utilizan principalmente los métodos de extracción líquido-líquido, por fluido supercrítico y en fase sólida.

❖ Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido involucra la diferencia entre la solubilidad de la toxina en fase acuosa y en fase orgánica de tal forma que la matriz biológica quede en la fase orgánica y la micotoxina en la fase acuosa.

❖ Extracción por fluido supercrítico

Se emplean fluidos supercríticos como CO₂ para extraer el compuesto requerido de la matriz. Sin embargo, este método es caro y se necesita equipo especial.

❖ Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida se basa en las interacciones selectivas entre una fase sólida adsorbente y un líquido que contiene los componentes a separar. Suele utilizarse como tratamiento previo de una muestra para su posterior análisis por técnicas cromatográficas, HPLC o CG por ejemplo. La elección del adsorbente es lo que permite favorecer la extracción de unos u otros compuestos en la fase líquida.

○ Métodos de separación

Existen varios métodos cromatográficos para el análisis de micotoxinas.^(44, 80)

❖ Cromatografía en capa fina

Es el método más popular para el análisis de micotoxinas y ofrece la posibilidad de analizar muchas muestras de manera económica. Se usa en general tanto para análisis cuantitativo como para análisis semi-cuantitativo.

❖ Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía HPLC (High Performance Liquid Chromatography por sus siglas en inglés) es un análisis moderno de micotoxinas en el que hay una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida.

❖ Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases se utiliza comúnmente para análisis de micotoxinas en alimentos y muchos protocolos se han desarrollado alrededor de este tema. Se utilizan como detectores el espectrómetro de masas (MS) y el detector de ionización de llama (FID).

❖ Electroforesis capilar

Para detectar dos toxinas relacionadas entre sí es necesario utilizar técnicas de separación además de alta sensibilidad. La separación ocurre por migración en un campo eléctrico dependiendo de la carga y la masa.⁵³

B. Los polímeros de impronta molecular y las micotoxinas

1. Los polímeros de impronta molecular (MIP)

a) Historia

La técnica de impronta molecular fue introducida a principios de los años treinta por un químico soviético, M.V. Polykov, quien condujo una serie de investigaciones en sílice para uso en cromatografía. Polykov observó que cuando preparaba un gel de sílice en presencia de un disolvente, la sílice resultante mostraba una capacidad de enlace preferente con dicho disolvente. El mecanismo propuesto por Polykov fue revisado minuciosamente por la comunidad científica pero no acabó por ser convincente.⁵⁴

En 1949, en la universidad de CALTECH, Frank Dickey, alumno de Linus Pauling, se involucró en la interacción entre matrices de sílice y diversos colorantes. Dickey observó que al remover el patrón de colorante, la sílice absorbía preferentemente ese colorante con respecto a los otros. Se considera que la sílice de Dickey es el primer material de impronta molecular.⁵⁴

El experimento de Dickey, en el que introdujo la plantilla en el silicato de sodio antes de polimerizar la mezcla produjo una influencia mayor sobre la sílice que en el experimento de Polykov, en el cual la plantilla se introdujo después de formar la sílice. Por eso la metodología utilizada por Dickey es semejante a la utilizada hoy. La impronta basada en sílice continuó hasta finales de los años sesenta y el número de publicaciones, mayormente dedicadas a cromatografía, era bastante bajo, sobre todo debido a las limitaciones en cuanto a estabilidad y reproducibilidad de los materiales de impronta en sílice.

Sin embargo, la impronta sobre sílice tuvo un repunte en los años noventa. Pinel *et al.*⁵⁵ demostraron que la impronta utilizando o-cresol como plantilla, sobre gel de sílice, era regioespecífica y permitía separar la plantilla de m-cresol y p-cresol. Hunnius *et al.*⁵⁶ prepararon sílices porosos por medio de un proceso sol-gel y encontraron que mostraban una sorprendente selectividad en la adsorción. En

2005, Ling publicó un trabajo en el que se utiliza un gel de sílice y alúmina molecularmente improntado para el reconocimiento de aminohormonas.⁵⁷

Existe una gran variedad de trabajos de impronta molecular basados en sílice, sin embargo esta rama de la química no despuntó sino hasta principios de los setenta, cuando se dejó de utilizar sílice para usar polímeros orgánicos, mucho más eficientes y selectivos. Los primeros polímeros de impronta molecular fueron reportados por Wulf, Shea y Mosbach y, a partir de entonces que la impronta molecular empezó a utilizarse industrialmente.¹² Así, desde 2010, se han publicado más de 3000 artículos de polímeros de impronta molecular.

b) Fundamentos de los MIP

Gran parte de la química, sobre todo en los seres vivos, se basa en interacciones intermoleculares, es decir fuerzas de unión débiles entre dos o más moléculas. La formación de estructuras complejas, como la doble hélice del DNA, las membranas celulares y otras, son un claro ejemplo de esto. Las enzimas también funcionan de esta manera, en el sitio activo existen fuerzas intermoleculares con el sustrato que permiten la catálisis de una reacción. En 1894, Emil Fisher planteó una analogía entre el funcionamiento de una enzima y el modelo de la llave y el cerrojo (figura 3), en ambos casos la enzima (cerradura) es específica a un sustrato (llave). Al igual que en muchas otras disciplinas, en la química se ha buscado replicar lo que ocurre en la naturaleza, biomímesis, y así nacieron los polímeros de impronta molecular. Los MIP funcionan de una forma análoga al modelo de la llave y el cerrojo, ya que se busca realizar un polímero con huecos específicos a una cierta molécula. El monómero funcional que da origen al polímero se escoge en función de las interacciones que puede tener con la molécula de interés, también llamada plantilla u horma. Estas interacciones pueden ser covalentes o no covalentes.¹²

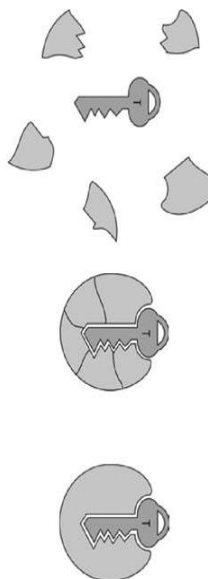


Figura 3. Modelo de la llave y el cerrojo de Emil Fisher.¹²

Para obtener estos polímeros de impronta molecular lo que se hace es preparar una matriz selectiva a una sustancia-sustrato (figura 4). Estas sustancias-sustratos pueden ser casi cualquier molécula desde amino ácidos, esteroides, iones metálicos o moléculas mucho mayores como polipéptidos o proteínas, incluso podrían ser células o virus. Sin embargo, la dificultad para hacer estos polímeros de impronta aumenta conforme aumenta el tamaño de la plantilla. En un primer paso, la molécula plantilla se encuentra en una mezcla con los monómeros funcionales que darán origen al polímero. Estos monómeros interactúan con la plantilla, de forma covalente o por fuerzas intermoleculares, y después polimerizan de tal manera que el polímero se forma alrededor de la plantilla. Al retirar la plantilla del polímero, lo que queda es una estructura que tiene la geometría, la conformación y los grupos funcionales específicos al reconocimiento molecular de la plantilla. Dicha estructura, en presencia de la plantilla, llegaría a un equilibrio entre tener los huecos libres y tener los huecos ocupados.¹²

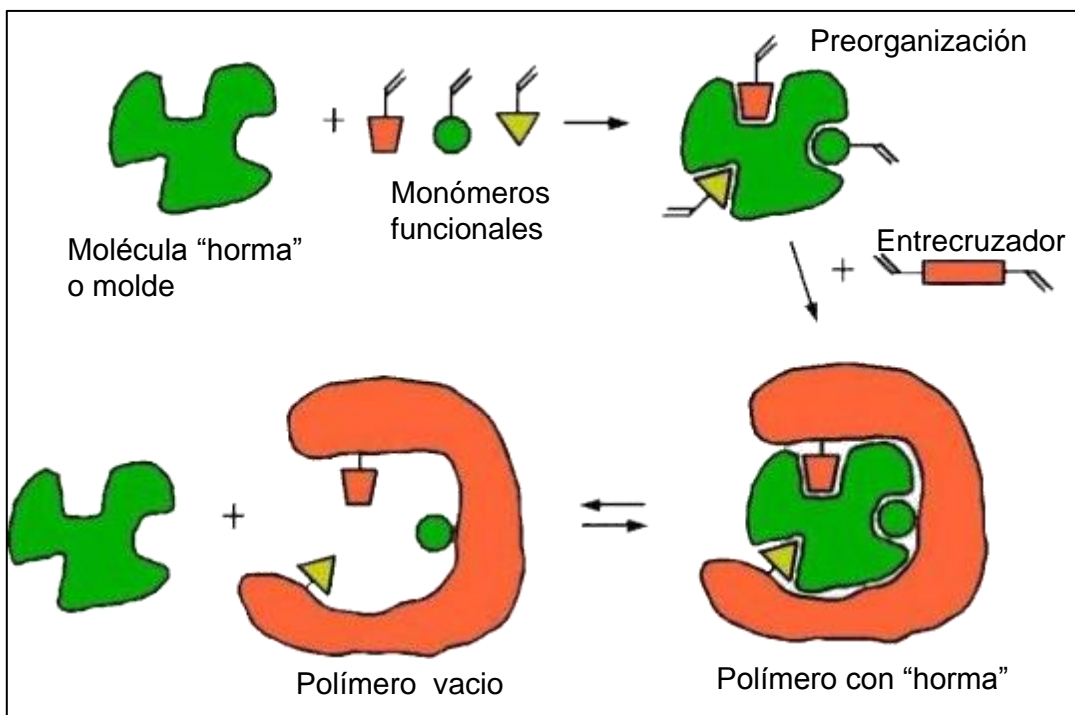


Figura 4. Esquema del proceso de impronta molecular.¹²

c) MIP covalentes y no covalentes

Existen fundamentalmente dos tipos de impronta molecular, la aproximación no covalente y la aproximación covalente.

Las interacciones no covalentes son aquellas que ocurren, por ejemplo, en sistemas biológicos entre las moléculas, tales como puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas. Se trata de una interacción débil comparada con los enlaces covalentes, sin embargo, cuando muchas interacciones débiles ocurren al mismo tiempo, conducen a un enlace fuerte. En la impronta molecular las fuerzas débiles que tienen lugar son las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones iónicas y fuerzas hidrofóbicas.

El monómero funcional más usado, el ácido metacrílico, puede transferir su protón ácido a algún grupo funcional básico de la plantilla, creando una interacción electrostática entre el carboxilato desprotonado y el grupo básico protonado, un

grupo amino por ejemplo. Las interacciones hidrofóbicas también son importantes, el agua repele los componentes hidrofóbicos y los confina, lo que facilita la impronta. El reconocimiento es bueno, sin embargo el equilibrio que existe entre el polímero con los huecos vacíos y el polímero con los huecos ocupados no se encuentra tan desplazado hacia este último, ya que son fuerzas de enlace débiles.

Las interacciones covalentes por su parte permiten que, durante la polimerización, el enlace entre la plantilla y el monómero sea muy estable, lo cual es una ventaja con respecto a los polímeros no covalentes. Sin embargo, son pocos los enlaces covalentes que una vez formados sea sencillo romperlos para permitir que la plantilla salga del polímero, esto ocurre, por ejemplo, con bases de Schiff ($R_1R_2C=NR_3$ donde R_3 es un grupo arilo o alquilo).

Los enlaces de coordinación son un tipo de enlaces covalentes, en los cuales el ligante dona pares de electrones al metal, lo que resulta en una fuerza de enlace alta entre el monómero y la plantilla en comparación con las fuerzas no enlazantes. Adicionalmente, ligantes que formen quelatos tendrán un aumento en la estabilidad. Sin embargo, la fuerza de enlace puede ser controlada por condiciones experimentales, como la elección del disolvente o del pH. Por lo tanto los enlaces de coordinación tienen a la vez la capacidad de formar enlaces muy fuertes y de permitir que la plantilla salga del polímero tras la polimerización, lo que hace que sea una estrategia muy eficiente.

En cada caso, es necesario sintetizar un polímero sin impronta para comparar la eficiencia de la impronta molecular. Estos polímeros se denominan NIP y son de vital importancia para poder decidir si el polímero de impronta molecular es o no suficientemente específico y eficiente. Al llevar a cabo la polimerización, con o sin plantilla, se forman huecos debido al monómero funcional, por lo tanto es necesario evaluar que el polímero de impronta tenga huecos específicos a la plantilla. Estos NIP se forman igual que los MIP, solamente se retira de la mezcla de reacción la plantilla.¹²

d) Factores que afectan un MIP

En el proceso de impronta molecular están involucrados varios componentes. La elección del monómero funcional es muy importante para lograr un buen resultado, más si se trata de un MIP no covalente ya que las fuerzas intermoleculares son las que permiten la interacción entre la plantilla y el monómero. De esta manera, si la plantilla contiene un ácido carboxílico, el monómero deberá contener una amina, de tal suerte que se produzcan interacciones iónicas. El monómero funcional más común es el ácido metacrílico (MAA), ya que permite las interacciones iónicas con algún grupo básico de la plantilla, sin embargo no es el único, casi cualquier grupo funcional unido a una molécula que contenga grupos susceptibles de polimerizar es un posible monómero funcional. Los monómeros funcionales constituidos de complejos de coordinación también se utilizan con frecuencia debido a que permiten tener a la vez una fuerza de enlace grande y remover la plantilla del polímero. Los monómeros suelen tener grupos vinilo para que se pueda realizar la polimerización.

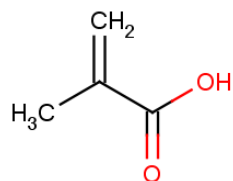


Figura 5. Ácido metacrílico.

Otros componentes que intervienen de manera importante en el proceso de impronta molecular son los entrecruzadores del polímero. Un entrecruzador es una especie que permite hacer el enlace entre una cadena polimérica y otra. Estos enlaces pueden ser covalentes o iónicos. Estos compuestos contienen normalmente grupos vinilo para promover la polimerización de los monómeros funcionales. Algunos entrecruzadores comunes son el etilenglicol dimetacrilato

(EGDMA), el triacrilato de pentaeritritol (PETA) y el tetraetilenglicol diacrilato (TEGDA) que se muestran en la figura 6.

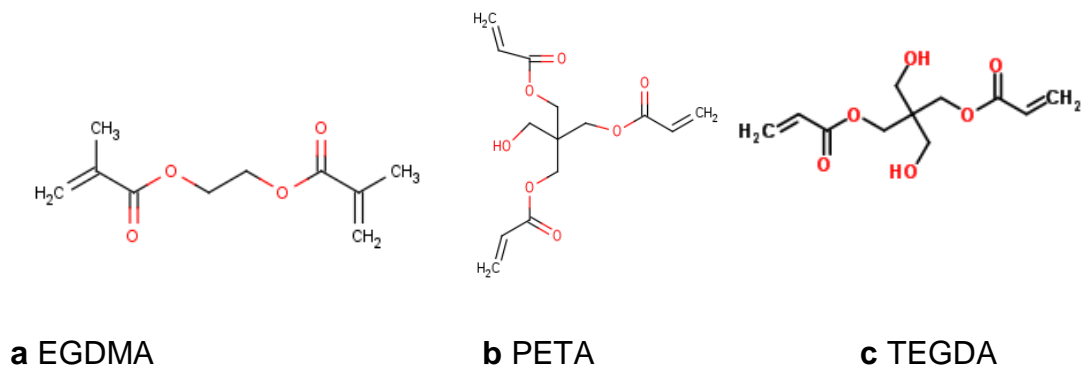


Figura 6. Estructuras de algunos entrecruzadores.

Para que pueda llevarse a cabo la polimerización, para la mayor parte de los casos es hacer una reacción por radicales libres, se necesita un iniciador. Un iniciador es un compuesto que a cierta temperatura o expuesto a radiación electromagnética de cierta longitud de onda es capaz de formar radicales libres que den inicio a la polimerización. El iniciador que se usa más comúnmente es el azoisobutironitrilo (AIBN) que se descompone fácilmente en nitrógeno gas y dos moléculas de radical 2-cianopropil.

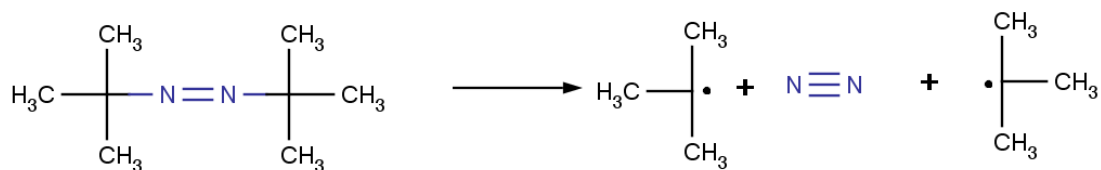


Figura 7. Reacción de formación de radicales libres a partir de AIBN

Finalmente, el disolvente elegido es de suma importancia para lograr un buen polímero impreso y esto se debe a las interacciones hidrofóbicas. Se suelen

utilizar disolventes orgánicos apróticos que tengan baja polaridad para evitar que interfieran con las interacciones iónicas y las fuerzas de Van der Waals que ocurren entre el monómero funcional y la plantilla. Si el disolvente es capaz de interaccionar fuertemente con la molécula horma, se puede destruir el complejo preorganizado entre la horma y los monómeros funcionales, dando como resultado un material con mala capacidad de reconocimiento molecular. Sin embargo, la elección del disolvente adecuado suele realizarse tras varias pruebas ya que es necesario ajustar las condiciones según la plantilla y el monómero. El disolvente más polar permitirá una mejor impronta del análogo menos polar y viceversa.

2. Las micotoxinas y los polímeros de impronta molecular

De 2010 a la fecha se han publicado alrededor de cien artículos que hacen referencia a la aplicación de los polímeros de impronta molecular sobre las micotoxinas, lo cual no es un número muy elevado. Sin embargo, año tras año, la cifra de artículos publicados sobre este tema ha ido en aumento y es que apenas se está comprendiendo realmente la trascendencia de estas toxinas.

En este apartado se nombrarán algunas investigaciones en materia de MIP y micotoxinas, como el trabajo de Navarro *et al.* para análisis de zearalenona (ZON) a partir de polímeros de impronta. El estudio consiste en preparar MIP a partir de análogos fluorescentes de ZON y con estos polímeros, fluorosensores, poder rastrear el desplazamiento de zearalenona en una mezcla.⁵⁸ En 2010, De Smet *et al.* desarrollaron un MIP para la extracción en fase sólida de ácido micofenólico con buenos resultados.⁵⁹ Por otra parte, en 2013, Cao *et al.* trabajaron en la extracción en fase sólida de ocratoxina A en una matriz real de jengibre para su detección.⁶⁰

Por lo tanto, veremos que existen varios trabajos acerca de las interacciones entre MIP y micotoxinas pero hay pocos trabajos enfocados a retirar las toxinas y están más bien orientados hacia su detección.

3. MIP y desoxinivalenol

a) Análogos de micotoxinas

La plantilla que hemos escogido para este trabajo no es la vomitoxina en sí, sino un análogo de la micotoxina (figuras 8 y 9) para reducir el manejo de compuestos tóxicos en el laboratorio, además de que aislar la toxina del hongo es un proceso complicado y se suelen obtener cantidades del orden de miligramos, lo que dificulta mucho usarlo como horma.⁵⁸ La estructura de estos análogos es semejante a la parte polar o la parte no polar de la vomitoxina lo que nos permitirá evaluar también que parte de la micotoxina es la que realmente se reconoce con el polímero.

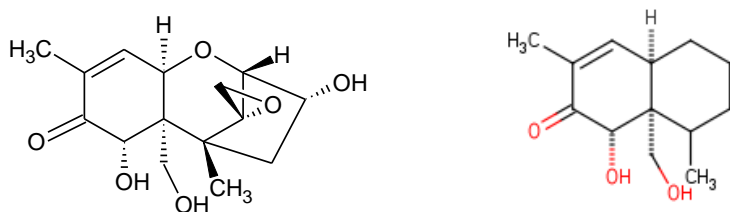


Figura 8. Estructura de la vomitoxina y de un posible análogo

Para este trabajo utilizamos dos análogos, uno polar y uno no polar, cuyas claves son CC89 y CH4 respectivamente y fueron sintetizadas por la compañía NUTEK (figura 9.).



Figura 9. Estructura de análogos CC89 y CH4

Como se puede apreciar, los análogos CC89 y CH4 son muy similares estructuralmente a las mitades de la vomitoxina y de ahí el interés en usarlos como análogos. En el caso de CH4, el grupo silano tiene por función proteger al alcohol y darle a la molécula un volumen más similar al de la toxina real.

b) Trabajos relacionados

Se han publicado pocos artículos referentes a los polímeros de impronta molecular y al desoxinivalenol. Pascale *et al.*⁹ en 2008 simularon computacionalmente la interacción de DON con diferentes monómeros funcionales y encontraron que el ácido itacónico ($C_5H_6O_4$) que es muy parecido al ácido metacrílico pero con un grupo carboxílico más (figura 10), tiene gran afinidad a DON en la formación de polímeros de impronta.

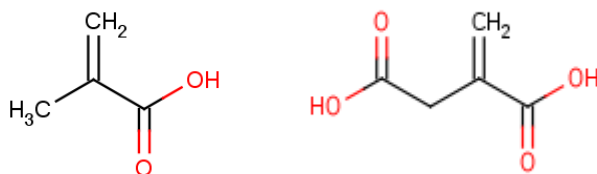


Figura 10. Ácido metacrílico y ácido itacónico.

C. Compuestos de coordinación y MIP

1. Compuestos de coordinación con zinc

Los compuestos de coordinación del zinc han sido considerados durante mucho tiempo como compuestos de poco interés, sin embargo en química de materiales, catálisis, medicina y biología han tenido un fuerte desarrollo en los últimos años y el zinc se ha convertido en un elemento central en muchas investigaciones. Ejemplos de esto han sido el descubrimiento del rol clave del zinc en la expresión de los genes o su papel en el sistema nervioso central. El desarrollo de polímeros de impronta ha impulsado también la investigación acerca del zinc, ya que se utiliza con frecuencia en los complejos de impronta molecular.¹²

Las geometrías más frecuentes son la tetraédrica y la octaédrica pero también se han observado numerosos casos de cuadrados planos o compuestos pentacoordinados. El zinc puede adoptar muchas geometrías distorsionadas sin que la energía cambie demasiado, lo cual es una ventaja importante para la formación del complejo que se plantea en este proyecto.

Los complejos de zinc se utilizan frecuentemente en construcciones supramoleculares debido al estado de oxidación inerte (2^+) y a la flexibilidad que otorga en cuanto a número y geometría de coordinación.⁶¹

Los ligantes piridil forman compuestos tetracoordinados y hexacoordinados aunque es más común encontrar compuestos tetraédricos con ligantes donadores N, y se ha demostrado que la estabilidad de estos compuestos aumenta linealmente conforme aumenta la basicidad del derivado de piridina. La formación de estos complejos es más favorable si se lleva a cabo en disolventes poco polares debido a que la solvatación del ión metálico es menor.⁶²

2. Complejos de impronta molecular

Las enzimas y los receptores biológicos, a partir de los cuales se idearon los polímeros de impronta molecular, tienen sitios de reconocimiento molecular que suelen estar asociados a la catálisis de una reacción. Muchas de estas macromoléculas biológicas tienen, en su sitio de reconocimiento, iones metálicos que permiten el arreglo estructural del sitio, para facilitar la captación de sustratos, y catalizan la reacción al acercar de la forma adecuada, al sustrato con los ligantes. El uso de estos iones metálicos es lo que permite que los sitios de reconocimiento y la catálisis sean selectivos. En los polímeros de impronta molecular los iones metálicos permiten un mejor control del microdominio y por ende un mejor control sobre la confección del hueco específico.¹²

Los polímeros sintéticos se utilizan mucho para formar arreglos de grupos funcionales con la esperanza de lograr una actividad semejante a la de un enzima, y a su vez el entendimiento de los mecanismos de acción de las enzimas ha permitido diseñar polímeros de impronta cada vez más sofisticados. En la impronta no covalente, la interacción favorable entre el monómero funcional y la plantilla se ve limitada por la baja constante de asociación entre la plantilla y los monómeros funcionales, normalmente compensada por un exceso estequiométrico del monómero con respecto a la plantilla. El problema radica en que a pesar de tener algunos huecos suficientemente específicos, hay muchos huecos no específicos, lo que hace que estos polímeros sean menos eficientes.

Una alternativa es utilizar enlaces monómero-plantilla más fuertes, como pueden ser los enlaces de coordinación metal-ligante, que son capaces de lograr un orden tridimensional de los grupos funcionales en el hueco específico con mucha menor cantidad de huecos no específicos. La orientación de los grupos funcionales en el polímero de impronta se debe a la estructura bien definida de los complejos metálicos, que puede ser modulada por el uso de diferentes ligantes. Además, al ser enlaces más fuertes que las interacciones no covalentes, se reduce el número de grupos funcionales orientados al azar y por ende se reducen los sitios no

específicos, y se pueden utilizar cantidades estequiométricas de plantilla y monómero funcional.

Las características a tomar en cuenta a la hora de generar un sitio con un centro metálico en un MIP son:

- Compatibilidad con las condiciones de polimerización: si la polimerización se lleva a cabo por radicales libres, el metal no debe inhibir o participar en los pasos de iniciación o propagación. El uso de zinc en complejos tetraédricos de 18 electrones es apropiado debido a que no tiene electrones desapareados que interfieran con los radicales libres.
- El centro metálico debe tener una esfera de coordinación bien definida. Los metales de transición con geometrías variadas pueden resultar en arreglos poco definidos de los grupos funcionales en el hueco.
- El enlace entre el metal y la plantilla debe ser estable en las condiciones de polimerización y al mismo tiempo suficientemente lábil como para que pueda removerse la plantilla del hueco y dejar el hueco libre.¹²

Una gran cantidad de publicaciones se han enfocado a la preparación de complejos metálicos poliméricos de impronta molecular y los resultados han sido muy prometedores. Erdem *et al.* sintetizaron polímeros de impronta molecular con centros metálicos para catálisis en la hidrólisis de un éster de organofosfato utilizado como pesticida, y obtuvieron resultados muy positivos sobre todo para MIP con cobalto(II).⁶³ Por su parte, Baghel *et al.* desarrollaron polímeros de impronta con metales para el reconocimiento selectivo de iones metálicos como cobre.⁶⁴ La investigación de Prasad *et al.* sobre metalopolímeros de impronta para detección enantioespecífica de ácido d-/l-piroglutámico también es una muestra de éxito de los complejos poliméricos de impronta molecular.⁶⁵ Finalmente, Severin *et al.* diseñaron metalopolímeros de impronta molecular para catálisis. Estos MIP permiten tener un sistema que controla el microdominio alrededor del metal y que facilita que este último reconozca el sustrato y lo active.^{66 67}

D. Caracterización

1. Cromatografía de gases

a) Fundamentos de cromatografía

La cromatografía se define como un método físico de separación en el cual los componentes que se busca separar están distribuidos en dos fases, una fija (fase estacionaria) y otra que se mueve en una dirección finita (fase móvil).⁶⁸

Existen dos fenómenos que permiten que ocurra la separación de una muestra compleja por cromatografía: elución y desplazamiento. En la elución la fase móvil interacciona menos con la fase estacionaria que los solutos, por lo tanto los solutos avanzan más lentamente sobre el lecho cromatográfico. En el desplazamiento, por otra parte, la fase móvil interacciona más con la fase estacionaria que los solutos y migra más lentamente. Los analitos se distribuyen en fase móvil/fase estacionaria por interacciones intermoleculares, puentes de hidrógeno o fuerzas dipolo-dipolo.

La separación puede ocurrir por cuatro diferentes mecanismos. El primero es por adsorción del analito en la fase estacionaria, la FM arrastra al analito a través de la fase estacionaria y por contacto el analito se adsorbe sobre la superficie de la FE. También puede haber separación por reparto entre las dos fases, existe un equilibrio entre el analito en la FE y la FM y se lleva a cabo una extracción del analito hacia la FE. Por intercambio iónico, un catión (anión) de la FM se intercambia con otro catión (anión) de la FE de la misma manera que ocurre en las resinas de intercambio iónico. Finalmente, puede haber separación por exclusión molecular y esto consiste en una filtración en la cual las partículas más pequeñas avanzan rápidamente sobre la fase estacionaria mientras las partículas grandes encuentran mayores obstáculos y tardan más en migrar.

Tabla 2. Diferentes tipos de cromatografía⁶⁹

Tipos	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía en papel	Líquido	Líquido (moléculas de agua contenidas en la celulosa del papel)
Cromatografía en capa fina	Líquido	Sólido
Cromatografía de gases	Gas	Sólido o líquido
Cromatografía líquida en fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida de absorción	Líquido	Sólido
Cromatografía de fluidos supercríticos	Fluido supercrítico	Sólido o líquido

En cromatografía de gases (GC) las muestras deben ser volátiles y termoestables o formar derivados que cumplan estas características. El disolvente debe ser más volátil que cualquier componente de interés. La temperatura inicial de la columna debe estar por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente, y la temperatura del inyector debe ser la suficiente para volatilizar la muestra.⁶⁹

b) Parámetros cromatográficos

En un cromatograma, el tiempo de retención es el tiempo que tarda en eluir un soluto y es característico para cada sustancia en ciertas condiciones establecidas. El área bajo el pico que se presenta en el cromatograma es proporcional a la concentración.

Antes de comenzar un análisis por cromatografía es necesario optimizar algunos parámetros que harán mejor la separación de la muestra.

La eficiencia representa el número de equilibrios de distribución entre el analito y la fase estacionaria en una longitud de columna, cuanto menor sea el valor numérico mayor será la eficiencia en tanto que concepto.

La selectividad es la relación entre el tiempo de retención de dos especies, cuanto mayor sea el cociente más separados se encuentran los picos en el cromatograma y es más selectivo, porque una especie es mucho más afín a la fase estacionaria que la otra especie.

La capacidad, k' , es la relación entre el tiempo de retención corregido de una especie y el tiempo muerto (tiempo que tarda en atravesar la columna una especie que no es nada afín a ésta).

La resolución corresponde a la separación de los picos en el cromatograma, cuanta más resolución los picos están más separados, se obtiene con la ecuación:

$$R = \frac{tr_2 - tr_1}{\frac{1}{2}(wb_1 + wb_2)}$$

Siendo wb el ancho de la base del pico cromatográfico y tr el tiempo de retención del pico.⁶⁹

c) Instrumentación

El instrumento utilizado en este proyecto es un cromatógrafo Agilent 7890-A y consta de un inyector split/splitless, un horno en el cual se encuentra la columna

capilar HP-5 (32m de longitud, 0.25mm de diámetro y 0.25µm de espesor) y dos detectores (FID ionización de llama y TCD detector de conductividad térmica) la fase estacionaria es 95% dimetilpolisiloxano y 5% fenil, y la fase móvil es Hidrógeno.

La vomitoxina y sus análogos sintéticos no muestran fluorescencia y su absorción en el espectro es de alrededor de 215nm, lo que coincide con la mayor parte de los disolventes orgánicos. Sin embargo en cromatografía de gases muestra un pico con tiempo de retención 7.7min y por eso se utiliza esta técnica para cuantificarla.

❖ Inyector

En el laboratorio contamos con un inyector split/splitless que permite inyectar la muestra con o sin división de flujo.

El modo split permite inyectar grandes volúmenes de muestra en una columna capilar sin sobrecargarla al dividir el flujo y desechar la mayor parte de la inyección. Por su parte, el modo splitless consiste en inyectar la muestra diluida en un disolvente volátil y con la válvula split inicialmente cerrada, suele utilizarse para análisis de trazas de compuestos bioorgánicos. La resolución del pico y la vida media de la columna pueden verse severamente afectadas si la columna se sobrecarga.

❖ Detectores

En el laboratorio contamos con dos tipos de detectores, uno de alta sensibilidad que destruye la muestra al quemarla (FID), y otro de menor sensibilidad pero que no destruye la muestra (TCD). En este trabajo utilizamos únicamente el detector de ionización de llama (FID).

➤ FID Detector de ionización de llama

El detector de ionización de llama es el detector más utilizado en cromatografía de gases. Es un detector destructivo y selectivo, es decir que no es capaz de detectar

cualquier compuesto. El efluente de columna se quema con una llama de oxihidrógeno (mezcla de oxígeno e hidrógeno) de alta temperatura en la que, por pirólisis, se obtienen iones y electrones. Debido a que conducen la corriente, se genera un potencial entre el quemador y un electrodo situado por encima de la llama. La señal depende del número de átomos de carbono que entran en el detector por unidad de tiempo. Esto permite detectar compuestos orgánicos que no presenten grupos carbonilo, aminas o halógenos.

d) Elección del método

La cromatografía de gases, al ser un método cuantitativo, nos permite conocer el porcentaje de micotoxina adsorbido en el polímero. En un primer lapso, se realiza la curva de calibración a diferentes concentraciones de micotoxina, después estas disoluciones se dejan agitando en presencia del polímero, se filtra y se obtienen los datos de la micotoxina restante en disolución. Por diferencia se conoce la concentración y el porcentaje de micotoxina adsorbida en el polímero.

Para elegir correctamente los parámetros (flujos de los diferentes gases, temperaturas de los componentes, tiempo de inyección) se deben considerar previamente algunos aspectos.

En cuanto a la temperatura de los componentes, se necesita una temperatura de inyector que permita volatilizar todos los compuestos de la mezcla, una temperatura del horno que permita la separación pero que no rebase la temperatura límite que soporta la columna y una temperatura del detector de al menos 25°C por encima de la temperatura final de la columna. Para la rampa de temperatura del horno, se suele utilizar el aumento máximo posible y a partir de ahí optimizar.

Al utilizar columnas empacadas, se pueden inyectar muestras de cientos de microgramos sin riesgo de sobrecargar la columna y obtener separación de los picos en la línea base. Sin embargo, al utilizar columnas capilares, como la que tenemos en el laboratorio, con menos de 20µg, se puede llegar a saturar la

columna, por lo tanto es un parámetro a evaluar y considerar a la hora de preparar el método.

Cuando se tienen concentraciones muy altas de los analitos se pueden utilizar métodos de inyección con división de flujo (split), mientras que para concentraciones bajas se suele utilizar inyecciones sin división de flujo (splitless). Sin embargo, se suelen hacer primero una inyección splitless y a partir de los resultados que se obtienen de la prueba se evalúa la necesidad de utilizar un método split.

En cuanto a los gases, es necesario e indispensable que éstos se filtren y purifiquen a través de mallas moleculares. Como gas acarreador, se recomienda siempre utilizar hidrógeno, ya que se tienen análisis más rápidos y precisos con detector FID. El flujo de H_2 suele rondar 35-55 mL/min. Por su parte el flujo de aire debe ser el necesario para permitir la ignición de la llama del detector, el equipo viene de fábrica con un flujo de aire de 400 mL/min y el flujo de N_2 , gas de referencia, suele rondar 20-30 mL/min sin rebasar el flujo total de la columna.

En cuanto al tiempo de retención se pretende que los elementos de interés tarden en eluir no menos de 5 minutos y no mucho más de 10 minutos, de tal forma que la eficiencia del pico y su resolución no se vean afectadas, aunque esto depende en gran medida de la mezcla que se analiza.

2. Isotermas de adsorción

Una isoterma de adsorción describe el equilibrio de adsorción de una sustancia en una superficie a temperatura constante. Existen muchos tipos de isotermas y cada modelo explica un fenómeno de adsorción distinto, a continuación detallaremos estos modelos.

El interés en la naturaleza de los sitios de reconocimiento de los polímeros de impronta molecular ha crecido en los últimos años. Se utilizan métodos numéricos y analíticos para calcular las isotermas de adsorción y la distribución de adsorción de energía como medida cuantitativa de la heterogeneidad del polímero.

Existen diversas razones por las cuales el sitio de reconocimiento del polímero es heterogéneo:

- En la polimerización, las cadenas poliméricas formadas por los entrecruzadores alrededor de la plantilla son aleatorias y, por lo tanto, hay diferentes grados de entrecruzamiento, lo que deriva en diferencias de afinidad, integridad y constantes de asociación entre los sitios de reconocimiento.
- Debido al poco control en la formación de los sitios se pueden tener:
 - Sitios de reconocimiento de gran afinidad
 - Sitios no específicos
 - Micrositios
 - Sitios cluster
 - Sitios colapsados
 - Sitios ocupados irreversiblemente

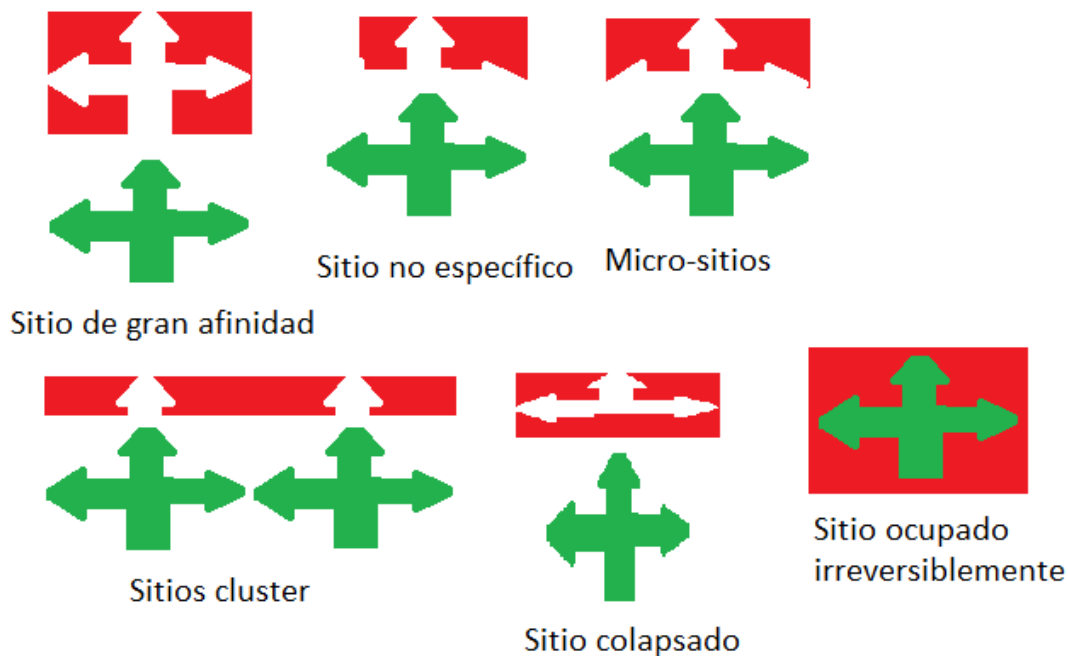
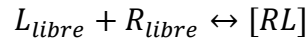


Figura 11. Sitios de reconocimiento en un polímero de impronta heterogéneo

A partir de este fenómeno surge la problemática de cómo caracterizar los sitios de reconocimiento. En términos generales, consiste en dejar que llegue al equilibrio una mezcla que tiene una disolución de concentración conocida de plantilla y el polímero, se filtra, se mide la concentración de plantilla que sigue en disolución y por resta se obtiene la concentración de plantilla adsorbida en el polímero.



Si consideramos que:

$$[RL] = B$$

$$L_{libre} = C$$

$$R_{libre} = (N_t - B)$$

Donde N_t es el número de centros activos disponibles del polímero por unidad de volumen.

Siendo L la plantilla libre en disolución, R el polímero de impronta agregado y RL el polímero con la plantilla adsorbida. Considerando que K_1 y K_{-1} son las constantes de adsorción y desorción, entonces la constante de equilibrio de desorción es:

$$\frac{L_{libre} \times R_{libre}}{[RL]} = K_d$$

$$K_d = \frac{C(N_t - B)}{B}$$

$$\frac{B}{N_t} = \frac{C}{K_d + C}$$

Esta es la ecuación de una hipérbola con una asíntota horizontal que corresponde a 100% de saturación del polímero. El cociente $f=B/N_t$ se refiere a la fracción ocupada y nos dice la cantidad de plantilla que se adsorbe por gramo de polímero. Cuando 50% de los sitios estén ocupados ($f=0.5$), el valor de K_d será igual a la concentración de plantilla en dicho punto. Finalmente, los valores de f y B , al

graficarse, permiten determinar la isoterma de adsorción para el polímero de impronta.

Una estrategia para evaluar los polímeros de impronta molecular es realizar experimentos de saturación y después un análisis Scatchard⁷⁰, que es un ajuste no lineal que permite ver de manera sencilla diferentes tipos de sitios de reconocimiento. Las curvas Scatchard se pueden descomponer en un cierto número de líneas rectas y esto indica el número de sitios de reconocimiento diferentes que hay en el polímero. Para confirmar dicha observación se debe garantizar que sea estadísticamente significativo y para ello se utiliza un test F.

En los últimos años, se han utilizado diferentes isothermas de adsorción para caracterizar los polímeros de impronta molecular. En algunos de estos modelos se supone un comportamiento ideal y no se consideran sitios clusters, colapsados u ocupados irreversiblemente. Por lo tanto, se pueden considerar tres tipos de modelos de adsorción: modelos discretos donde se asume comportamiento ideal, modelos continuos donde se consideran superficies heterogéneas y modelos híbridos.

❖ Modelos discretos

➤ Isotherma de Langmuir

Es el modelo más simple, después del modelo lineal, y se basa en tres supuestos: que sólo una plantilla puede adsorberse en un sitio, que la adsorción de la plantilla en un sitio es independiente de la ocupación de los sitios vecinos y que la adsorción se realiza en una monocapa.

Suponiendo una superficie con N sitios de reconocimiento homogéneos, una concentración de plantilla libre C y una constante de adsorción K, entonces B, la concentración de plantilla adsorbida, es:

$$B = \frac{NKC}{1 + KC}$$

$$\frac{C}{B} = \frac{1}{NK} + \frac{1}{N}C$$

Al graficar C/B vs C obtenemos los valores de N y K .

Esta aproximación está muy lejos de lo que en realidad ocurre. Si consideramos que el reconocimiento de la plantilla con el polímero incluye múltiples puntos de enlace y por lo tanto que hay enlaces localizados no homogéneos entonces es necesario considerar que hay m centros de reconocimiento homogéneos y entonces:

$$B = \sum_i^m \frac{N_i K_i C}{1 + K_i C}$$

Donde N_t es la suma de N_i .

➤ Isoterma de Jovanovic

La isoterma de Jovanovic se deriva de datos cinéticos y toma en cuenta, a diferencia de la isoterma de Langmuir, interacciones plantilla adsorbida/plantilla libre. Se expresa por la ecuación:

$$B = N(1 - e^{-KC})$$

Al igual que en el caso de la isoterma de Langmuir, para acercar el modelo a la realidad se utiliza el modelo Bi-Jovanovic, que consiste en considerar que hay dos tipos de sitios de reconocimiento distintos:

$$B = N_1(1 - e^{-K_1 C}) + N_2(1 - e^{-K_2 C})$$

Donde N_1 y N_2 corresponden a la capacidad de saturación y K_1 y K_2 son las constantes de adsorción.

❖ Modelos continuos

➤ Isoterma de Freundlich

Para poder describir la heterogeneidad de la superficie del polímero y la distribución continua de la energía se utilizan modelos no ideales como el de Freundlich. Fue encontrado de forma experimental y sigue la ecuación:

$$N(K) = \alpha e^{-mK/RT}$$

Donde α y m son constantes y $N(K)$ es la distribución de afinidad correspondiente a la energía de enlace K . La isoterma de Freundlich es una generalización de la isoterma de Langmuir, y expresa B como:

$$B = aC^m$$

Donde a es un factor pre exponencial experimental que depende de N_t y K_0 , y m es el índice de heterogeneidad, de 0 a 1, donde 1 es un sistema homogéneo.

$$\log B = \log a + m \log C$$

Al graficar $\log B$ vs $\log C$ podemos describir el sistema.

❖ Modelos híbridos

➤ Isoterma de Langmuir-Freundlich

La isoterma de Langmuir-Freundlich se expresa de la siguiente forma:

$$B = \frac{N_t K_0^m C^m}{1 + K_0^m C^m}$$

Donde N_t es el número total de sitios, K_0 es la afinidad media de enlace, m es el parámetro de heterogeneidad y a se define por:

$$K_0 = a^{1/m}$$

La ventaja de este modelo híbrido es que permite explicar el comportamiento del MIP si la concentración del soluto es alta, si la concentración del soluto es baja se reduce a la ecuación de Freundlich y si m tiende a 1, es decir un sistema

homogéneo, se reduce a la ecuación de Langmuir. Por lo tanto permite modelar la adsorción de solutos a altas y bajas concentraciones en MIP homogéneos y heterogéneos.

➤ Isoterma de Jovanovic-Freundlich

El modelo Jovanovic-Freundlich describe el equilibrio de adsorción de un solo componente en una superficie heterogénea, de tal forma que:

$$B = N_t(1 - e^{-Kc^m})$$

Cuando la superficie es homogénea, la ecuación se reduce a la expresión de Jovanovic, a bajas concentraciones de soluto la ecuación se reduce a la expresión de Freundlich y, finalmente, a altas concentraciones de soluto se obtiene una monocapa.⁷⁰

E. Referencias

- (18) Paliwal, R. L., *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*, FAO eds, FAO, Rome, **(2001)**.
- (19) Dowsell, C. D.; Patiwal, R. L.; Cantrell, R. P. *Maize in the third world*; Editorial: Westview Press: Boulder, Colorado, **(1996)**.
- (20) Galinat, W. C. *The origin of corn*; 3rd ed., Sprague & Dudley eds., p. 1-31 American Society of Agronomy: Madison, Wisconsin, **(1988)**.
- (21) Aldrich, S. R.; Scott, W. O.; Leng, E. R. *Modern corn production*; 2nd ed.; A & L Publications: Champaign, Illinois, **(1975)**.
- (22) CiMMYT 1993/94 *world maize facts and trends*, México, D.F., 56 páginas, **(1994)**.
- (23) INEGI, El sector alimentario en México en 2010, México, D.F., **(2013)**.
- (24) Mayor, J. W.; Harold, H. W. *General Biology*; 6th ed.; Collier-Macmillan: London- New York, **(1966)**.
- (25) Talbot, P. H. B. *Principles of Fungal Taxonomy*; Macmillan: London, **(1971)**.
- (26) Hawksworth, D. L. *Mycology Research* **(2006)**, p.641.
- (27) Sancho, L. G.; de la Torre, R.; Horneck, G.; Ascaso, C.; de los Rios, A.; Pintado, A.; Wierchos, J.; Schuster, M. *Astrobiology* **(2007)**, vol.3, p.443.
- (28) CAST *Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems* Ames, Iowa, USA, **(2003)**.
- (29) Leslie, J. F.; Bandyopadhyay, R.; Visconti, A. *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*; 1st ed., Editorial: CAB International: London, U.K., **(2008)**.
- (30) Shephard, G. S.; Barug, D.; Bhatnagar, D.; van Egmond, H. P.; van der Kamp, J. W.; van Osenbruggen, W. A.; Visconti, A. *Mycotoxins in the context of food risks and nutrition issues*; 1st ed., Wagen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, **(2006)**.

- (31) Robens, J.; Cardwell, K. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* (2003), p.139.
- (32) Wu, F. *Environmental Science and Technology* (2004), vol.44, p.4049.
- (33) Reboux, G. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* (2006), vol.46, p.208.
- (34) Loiseau, N.; Oswald, I. P.; Puel, O.; Galtier, P. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* (2005), vol. 1, p.45.
- (35) Hendry, K. H.; Cole, E. C. *Journal of Toxicology Environmental Health* (1993), vol. 1, p.83.
- (36) Husman, T. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* (1996), vol.22, p.5.
- (37) Coker, R. D. *Mycotoxins and their control: constraints and opportunities*, Natural Resources Institute, (1997).
- (38) FAO *Worldwide Regulations for Mycotoxins in Foods and Feeds in 2003*, FAO, (2004).
- (39) Lewis, L.; Onsongo, M.; Njapau, H.; Schurz-Rogers, H.; Luber, G.; Kieszak, S.; Nyamongo, J.; Backer, L.; Dahiye, A. M.; Misore, A.; DeCock, K.; Rubin, C. *Environmental Health Perspectives* (2005), vol.13, p.1763.
- (40) Carlile, M. J.; Watkinson, S. C.; Gooday, G. W. *The Fungi*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, California, USA, (2001).
- (41) Abarca, M. L.; Braugulat, M. R.; Castella, G.; Cabanes, F. J. *Applied and Environmental Microbiology* (1994), vol.60, p.2650.
- (42) Moore-Landecker, E. *Fundamentals of the Fungi*, 1st ed., Prentice Hall International Inc.: New Jersey, USA, (1996).
- (43) Marasas, W. F. O. *Environmental Health Perspectives* (2001), vol.109, p.239.
- (44) Shephard, G. S.; Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Gelderblom, W. C. A. *Journal of Liquid Chromatography* (1990), vol.13, p.2077.

- (45) Howard, P. C.; Eppley, R. M.; Stack, M. E.; Warbritton, A.; Voss, K. A.; Lorentzen, R. J.; Kovach, R. M.; Bucci, T. J. *Environmental Health Perspectives* **(2001)**, vol.109, p.277.
- (46) FDA *Guidance for industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds*, FDA (Food and Drug Administration), **(2001)**.
- (47) Marin, S.; Ramos, A. J.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V. *Food and Chemical Toxicology* **(2013)**, vol.60, p.218.
- (48) Sherif, S. O.; Salama, E. E.; Abdel-Wahhab, M. A. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **(2009)**, vol.212, p.347.
- (49) Pestka, J. J. *Animal Feed Science and Technology* **(2007)**, vol.137, p.283.
- (50) Rotter, B. A.; Prelusky, D. B.; Pestka, J. J. *Journal of Toxicology Environmental Health* **(1996)**, vol.31, p1103.
- (51) Bullerman, L. B.; Schroder, L. L.; Park, K.-Y. *Journal of Food Protection* **(1984)**.
- (52) Lauren, D. R.; Jensen, D. J.; Smith, W. A. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **(2006)**, vol.34, p.66.
- (53) Turner, N. W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A. *Analytica Chimica Acta* **(2009)**, vol.632, p.168.
- (54) Walsh, R., Waterford Institute of Technology, Thesis for Ph.D: Development and characterization of molecularly imprinted suspension polymers **(2010)**.
- (55) Pinel, C.; Loisil, P.; P., G. **(1997)**, vol.582.
- (56) Hunnius, M.; Rufinska, A.; Maier, W. F. *Microporous and Mesoporous Materials* **(1999)**, vol.389.
- (57) Ling, T. R.; Syu, Y. Z.; Taisi, Y. C.; Chou, T. C.; Liu, C. C. *Biosensors and Bioelectronics* **(2005)**, vol.901.
- (58) Navarro-Villoslada, F.; Urraca, J. L.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **(2007)**, vol.121, p.67.
- (59) De Smet, D.; Kodeck, V.; Dubruel, P.; Van Peteghem, C.; Schacht, E.; De Saeger, S. *Journal of Chromatography A* **(2011)**, vol.1218, p.1122.

- (60) Cao, J.; Zhou, S.; Kong, W.; Yang, M.; Wan, L.; Yang, S. *Food Control* **(2013)**, vol.33, p.337.
- (61) Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L. *Inorganic Chemistry: Principles of structure and reactivity*; 4th edition ed.; Harper Collins College Publishers, Inc.: London, UK, **(1993)**.
- (62) McCleverty, J. A.; Meyer, T. J. *Comprehensive Coordination Chemistry II*; 2nd ed.; ELSEVIER, **(2005)**, vol.6.
- (63) Erdem, M.; Say, R.; Ersöz, A.; Denizli, A.; Türk, H. *Reactive and Functional Polymers* **(2010)**, vol.70, p.238.
- (64) Baghel, A.; Boopathi, M.; Singh, B.; Pandey, P.; Mahato, T. H.; Gutch, P. K.; Sekhar, K. *Biosensors and Bioelectronics* **(2007)**, vol.22, p.3326.
- (65) Prasad, B. B.; Pandey, I. *Sensors and Actuators B: Chemical* **(2013)**, vol.186, p.407.
- (66) Recillas Mota, J. J.; Bernad Bernad, M. J.; Mayoral-Murillo, J. A.; Gracia Mora, J. *Reactive & Functional Polymers* **(2013)**, vol.73, p.1078.
- (67) Severin, K. *Current Opinion in Chemical Biology* **(2000)**, vol.4, p.710.
- (68) Ettre, L.S., Nomenclature for chromatography, IUPAC, Pure &Appl. Chem., Great Britain **(1993)**, vol.85, p.819.
- (69) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*; 5th ed.; McGraw Hill: Madrid, España, **(2001)**.
- (70) García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E. *Sensors and Actuators B: Chemical* **(2007)**, vol.123, p.1180.

VI. Parte experimental

A. Planteamiento del proyecto

El proyecto se llevó a cabo en cuatro etapas. Primero, se sintetizaron los polímeros de impronta molecular, variando el monómero funcional, el entrecruzador y el análogo de micotoxina. Segundo, se constató la diferencia en adsorción entre el polímero de impronta y el polímero sin impronta. Tercero, se evaluó el efecto del disolvente en la adsorción del análogo vía cromatografía de gases. Cuarto, se comparó la selectividad y eficiencia de los polímeros al cambiar el monómero y el entrecruzador.

B. Preparación de los polímeros

Los polímeros se prepararon de la siguiente manera: se agregó en un tubo de ensaye el monómero funcional, el entrecruzador, la horma o plantilla (en proporción 4:20:1) y el disolvente. Se agitó y se homogeneizó en el baño sónico para que todos los componentes se encontraran en la misma fase. Se purgó la solución con nitrógeno por un minuto. Se agregó el iniciador y se calentó en un baño de aceite a 65°C por 24 horas. Una vez obtenido el polímero se molió finamente y se realizaron lavados sucesivos con disolvente durante al menos 5 horas cada uno. Se secó al vacío y se guardó en un vial. Se esquematiza el procedimiento en la figura 12. El NIP, polímero sin impronta, se preparó de la misma forma pero sin agregar la plantilla a la mezcla de reacción. En el caso en el que el monómero funcional es el complejo de zinc y 4-vinilpiridina, se formó primero el complejo añadiendo ambas sustancias en proporción 1:2 y agitando a temperatura ambiente 15 minutos.⁷¹ El ligante que se utilizó fue 4-vinilpiridina, que es ligeramente más alcalino que la piridina (5.62 contra 5.16) y por lo tanto podemos pensar que el complejo metal-ligante será suficientemente estable como para utilizarse como monómero funcional en un polímero de impronta molecular. Se podría pensar en utilizar un ligante bidentado, que por efecto quelato sería más

estable, sin embargo el ligante escogido reúne dos características importantes, la estabilidad y la disponibilidad en el laboratorio.

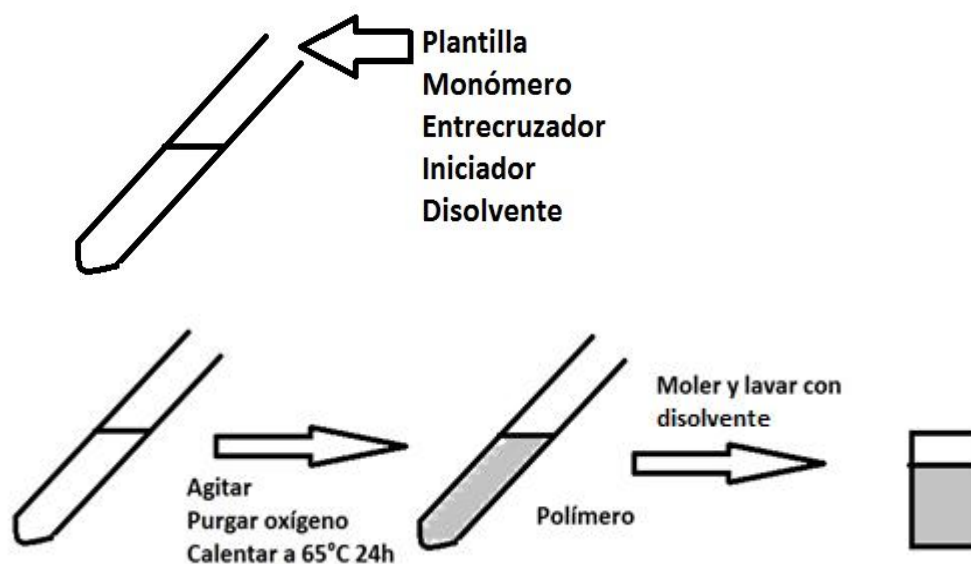


Figura 12. Esquema de la metodología de polimerización

1. Polímero sin impronta molecular (NIP)

Primero se sintetizó un polímero sin impronta (NIP). Las condiciones de síntesis se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. NIP no covalente

Tipo	Nombre	Masa (g)	Volumen (mL)
Análogo de micotoxina		0.0000	
Monómero funcional	Metacrilato	0.0581	
Entrecruzador	EGDMA	0.6694	
Disolvente	CHCl ₃		3.0

2. Análogo CH4

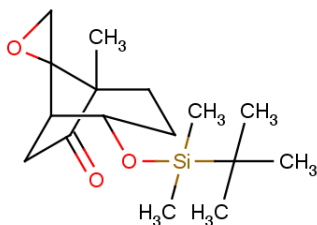


Figura 13. Estructura del análogo CH4

a) Polímero de impronta molecular no covalente

Se realizaron dos polímeros de impronta no covalentes utilizando el análogo CH4, al ser un análogo poco polar, se utilizó cloroformo como disolvente.

Tabla 4. MIP no covalente

Polímero	Monómero funcional	Entrecruzador	Disolvente
1	Metacrilato	EGDMA	CHCl ₃
2	Metacrilato	PETA	CHCl ₃

Se presentan a continuación los valores utilizados para la preparación de los polímeros no covalentes de CH4.

Tabla 4.bis. Condiciones para síntesis de MIP no covalente

Polímero	m _{análogo}	m _{monómero}	m _{entrecruzador}	V _{disolvente}	m _{AIBN}
1	0.0500	0.0581	0.6694	3.0	0.0005
2	0.0500	0.0581	1.0074	3.0	0.0005

b) Polímero de impronta molecular covalente

Tabla 5. MIP covalente

Polímero	Monómero funcional	Entrecruzador	Disolvente
3	Complejo de zinc y 4-vinilpiridina	EGDMA	CHCl ₃

El primer paso para formar este MIP covalente es formar el complejo de zinc, 4-vinilpiridina y el análogo CH4. Para ello se utilizó una sal de triflato de zinc (trifluorometanosulfato de zinc) en la cual el metal se encuentra en estado de oxidación 2+ y ocurre la siguiente reacción:

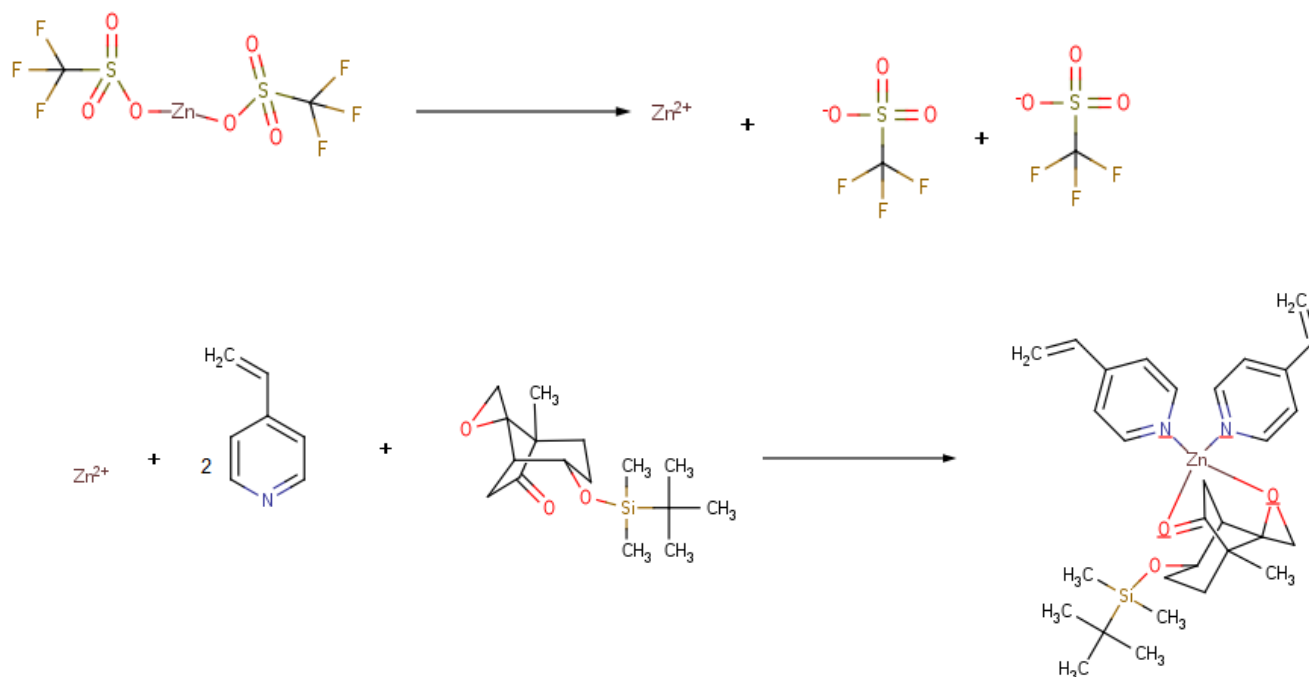


Figura 14. Reacción de formación del complejo de zinc, 4-vinilpiridina y el análogo CH4

Tabla 5.bis. Condiciones para síntesis de MIP covalente

Polímero	m _{análogo}	m _{Zn}	m _L	m _{entrecruzador}	V _{disolvente}	m _{AIBN}
3	0.0500	0.0110	0.0180	0.6694	3.0	0.0005

Una vez formado el polímero, se lava para retirar la plantilla. En dicho paso el ión metálico también es retirado, por lo que es necesario hacer una etapa de recuperación en la cual se deja el polímero agitando durante al menos una hora con triflato de zinc, de tal forma que el ión metálico recupere su sitio en el hueco moldeado,

3. Análogo CC89

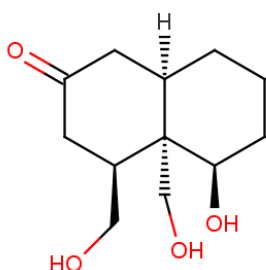


Figura 15. Estructura del análogo CC89

a) Polímero de impronta molecular no covalente

De la misma manera que para el análogo CH4, se prepararon dos polímeros de impronta no covalentes utilizando el análogo CC89. Sin embargo, al ser un análogo más polar, se utilizó como disolvente metanol.

Tabla 6. MIP no covalente

Polímero	Monómero funcional	Entrecruzador	Disolvente
4	Metacrilato	EGDMA	MeOH
5	Metacrilato	PETA	MeOH

Se presentan a continuación los valores utilizados para la preparación de los polímeros no covalentes de CC89.

Tabla 6.bis. Condiciones para síntesis de MIP no covalente

Polímero	m _{análogo}	m _{monómero}	m _{entrecruzador}	V _{disolvente}	m _{AIBN}
4	0.0500	0.0754	0.8683	3.0	0.0007
5	0.0500	0.0754	1.3067	3.0	0.0007

b) Polímero de impronta molecular covalente

Tabla 7. MIP covalente

Polímero	Monómero funcional	Entrecruzador	Disolvente
6	Complejo de zinc y 4-vinilpiridina	EGDMA	MeOH

El complejo se sintetiza de igual forma que para el análogo CH4, y ocurre la siguiente reacción:

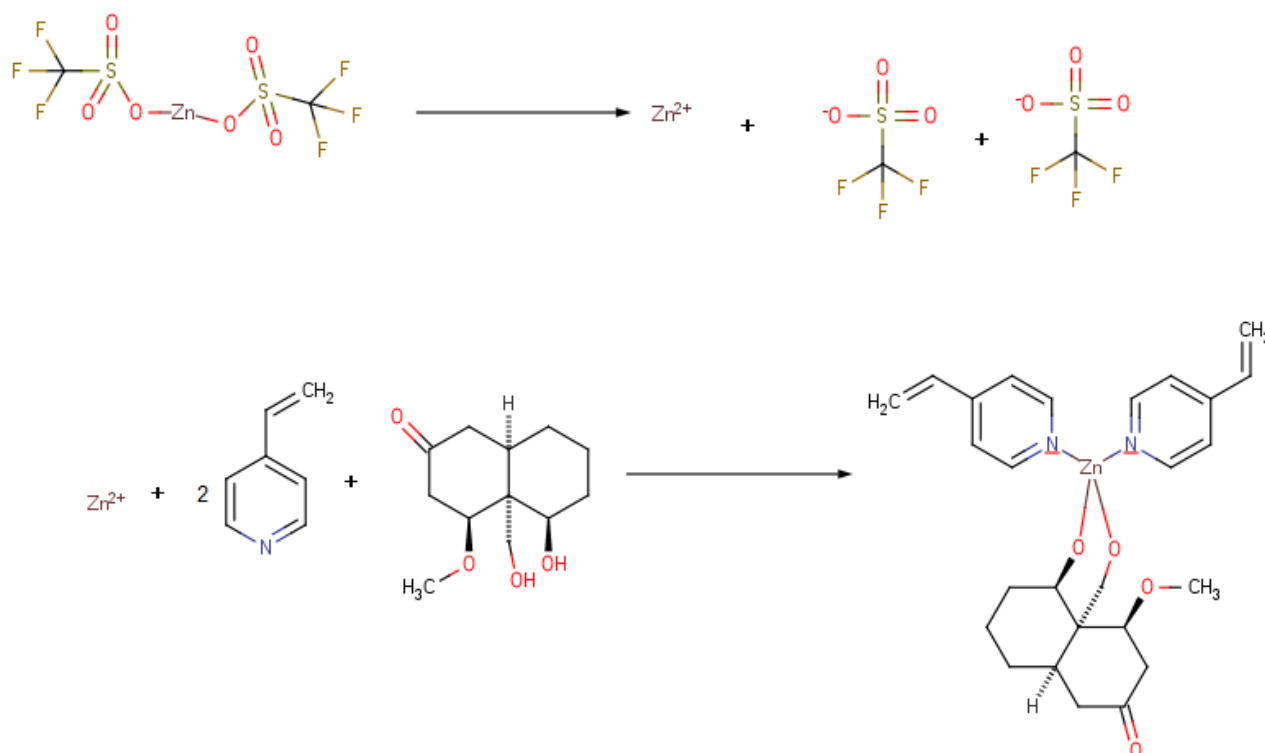


Figura 16. Reacción de formación del complejo de zinc, 4-vinilpiridina y el análogo CC89

Tabla 7.bis. Condiciones para síntesis de MIP covalente

Polímero	m_{análogo}	m_{Zn}	m_L	m_{entrecruzador}	V_{disolvente}	m_{AIBN}
6	0.0500	0.0140	0.0360	0.8683	3.0	0.0007

De igual forma que para el análogo CH₄, se realiza el lavado y la etapa de recuperación de zinc.

Finalmente obtuvimos 7 polímeros que nos permitieron evaluar cuáles son las condiciones ideales para la adsorción de la micotoxina.

C. Isotermas de adsorción

Una vez que se prepararon los polímeros de impronta molecular se realizó el siguiente experimento para determinar la eficiencia de adsorción de la plantilla. Se prepararon varias disoluciones de diferentes concentraciones de micotoxina, con las que se realizó una curva de calibración en el cromatógrafo de gases, y se le agregó a cada una, una misma masa de polímero. Se agitó la mezcla durante al menos 5 horas y se filtró. La disolución resultante se inyectó al cromatógrafo de gases y se cuantificó la concentración de micotoxina que no ha sido adsorbida por el polímero. La concentración adsorbida por el polímero corresponde entonces a la resta de la concentración inicial de cada disolución y la concentración obtenida a partir del análisis instrumental. Con los datos se realizó una curva de concentración adsorbida en función de la concentración inicial y se obtuvo así la isoterma de adsorción.⁷²

Experimentalmente, se pesaron en la balanza analítica 0.0228 g y 0.0296 g de los análogos CC89 y CH4 respectivamente, se llevaron a un aforo de 10,0mL. Se repitió la operación y se obtuvieron dos disoluciones para cada análogo de concentración 10^{-2} M.

$$n = CV$$

$$\frac{m}{M} = CV$$

$$m_{CC89} = MCV = 228 \times 10^{-2} \times 10 \times 10^{-3} = 0.0228g$$

$$m_{CH4} = MCV = 296 \times 10^{-2} \times 10 \times 10^{-3} = 0.0296g$$

A partir de estas disoluciones, se prepararon por dilución el resto de las disoluciones que conformaron la curva de calibración.

Tabla 8. Preparación de las disoluciones de la curva de calibración

Volumen de alícuota	Volumen de aforo	Concentración final
4,0mL	5,0mL	8×10^{-3} M
3,0mL	5,0mL	6×10^{-3} M
2,0mL	5,0mL	4×10^{-3} M
1,0mL	5,0mL	2×10^{-3} M

Una vez preparadas las disoluciones, se inyectaron al cromatógrafo de gases y se obtuvieron los cromatogramas correspondientes. A continuación, se tomaron 5mL de cada disolución, se les añadió 0.05g de polímero y se agitó durante por lo menos 5h, que es el tiempo que se tarda en llegar al equilibrio entre el polímero hueco y el polímero ocupado.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 7890-A con inyector split/splitless y detector de ionización de llama. Se utilizó una columna capilar HP5 (30m, 0.25mm de diámetro interno, 0.25 μ m de fase). El gas acarreador utilizado fue hidrógeno con flujo constante de 1mL/min. La inyección se realizó en modo splitless (0.5min). El programa de temperatura utilizado fue 40°C (1min), 25°C/min hasta 300°C (2min). La temperatura del detector fue 300°C.

D. Ligante Nvb-dpa

Se sintetizó también un ligante bidentado funcionalizado que pudiera hacer al complejo zinc-ligante más estable y al polímero más eficiente y selectivo. A continuación se presentará la síntesis del ligante, aunque no se realizó el polímero concerniente ni sus correspondientes estudios, debido a que se realizaron antes en el laboratorio ensayos de la interacción de iones metálicos, ligantes bidentados y el análogo de micotoxina CH4, que mencionaremos en la discusión.

Se diseñó la síntesis de un ligante con dos grupos donadores de nitrógeno de tal forma que formara un complejo quelato con el zinc, aumentando la estabilidad del complejo, la constante de formación del mismo y teniendo propiedades para la polimerización.⁷³⁻⁷⁶

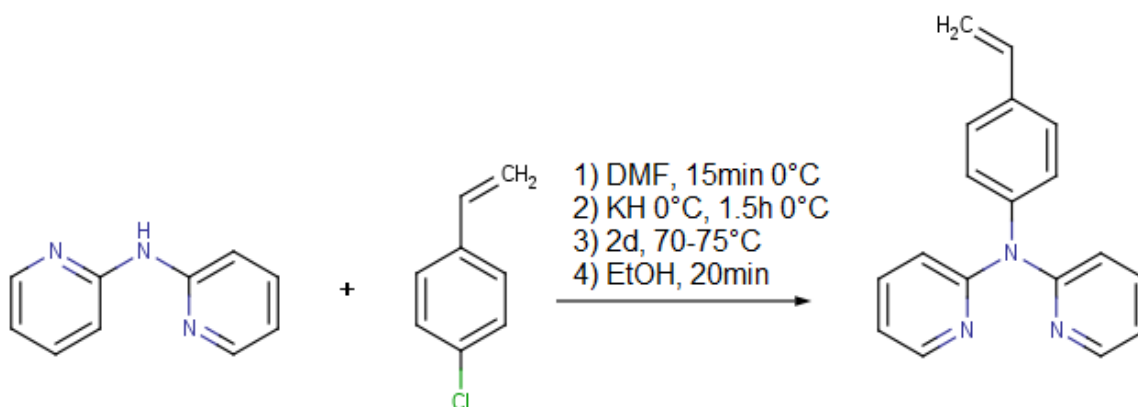


Figura 17. Síntesis de 2,2'-dipiridilaminbencilo

Metodología:

En un matraz bola, perfectamente seco y en atmósfera inerte, se agrega 2,2'-dipiridilamina (H-dpa) y cloruro de p-vinilbencilo. A continuación se agrega el disolvente, DMF seco, y se agita la mezcla por quince minutos a 0°C en baño de hielo. En otro matraz en atmósfera inerte, se agrega hidruro de sodio y se disuelve en DMF seco. Manteniendo la temperatura a 0°C, se agrega, por medio de una cánula y por diferencia de presiones, la disolución de hidruro de sodio en el matraz que contiene H-dpa y cloruro de p-vinilbencilo, y se agita una hora y media.

Transcurrido este tiempo se calienta la mezcla de reacción a 75°C y se agita por dos días. Finalmente se agrega etanol y se agita veinte minutos.

La purificación del producto se realiza por cromatografía en columna. Para ello, se empaca una columna de vidrio con sílica gel y se agrega eluyente, hexano/acetato de etilo (7:3) hasta el borde la columna. Por su parte se le agrega al producto sílica y disolvente y posteriormente se evapora el disolvente de tal forma que el producto quede fijado en la sílica. Se agrega el producto a la columna, se pasa a través de la columna eluyente y se colectan fracciones. La separación se sigue por cromatografía en capa fina. Finalmente, se juntan todas las fracciones que contienen producto puro y se evapora el eluyente.

E. Referencias

(71) Yan, M.; Ramström, O. *Molecularly imprinted materials science and technology*, 1st ed.; Marcel Drekker: New York, USA, (2005).

(72) García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E. *Sensors and Actuators B* (2007), vol.123, p.1180.

(73) Dorokhov, V.; Baryshnikova, T.; Gordeev, M. *Seriya Khimicheskaya* (1991), vol.1, p.155.

(74) Fakih, S.; Tung; Wing; Chau; Eirhoff, D. *Zeitschrift fuer Anorganische und Allegemeine Chemie* (2005), vol.631, p.1397.

(75) Lucciulli, S.; Thapa *Angewandte Chimie International* (2010), vol.49, p.9225.

(76) Oh, Y. *Journal of the Korean Chemical Society* (2000), vol.44, p.507.

VII. Resultados y discusión

A. Polímeros no covalentes

A continuación se presenta la caracterización de los polímeros NIP EGDMA, que es un polímero sin impronta molecular sintetizado con el entrecruzador EGDMA, MIP EGDMA CH₄, que es un polímero de impronta al análogo CH₄ con el mismo entrecruzador, y MIP PETA CH₄, que es un polímero de impronta al análogo CH₄ pero utilizando PETA como entrecruzador.

1. NIP EGDMA

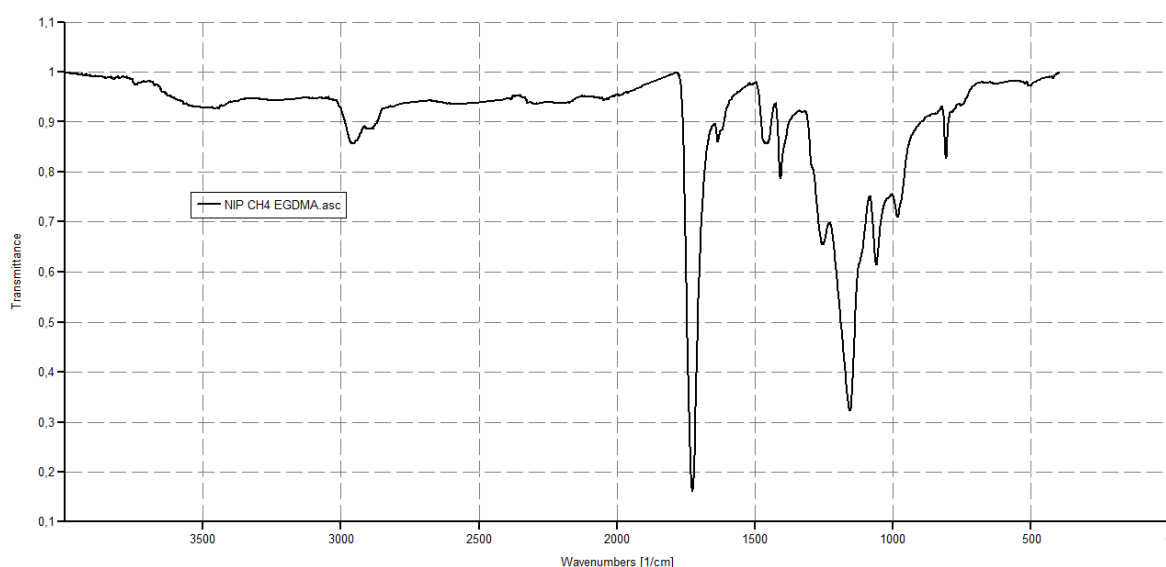


Figura 18. Espectro de infrarrojo del polímero sin impronta NIP

En el espectro de IR de NIP EGDMA esperamos encontrar bandas características del ácido metacrílico y del entrecruzador, etilenglicol dimetacrilato (EGDMA), la tabla 9 resume estas interacciones.

Tabla 9. Resultados del espectro de IR para el polímero NIP EGDMA⁷⁷

Molécula	Grupos funcionales	Número de onda esperado (cm ⁻¹)	Número de onda encontrado (cm ⁻¹)
Ácido metacrílico C ₄ H ₆ O ₂	-CH ₃	2960 2870 1460 1380	2962 2890 1477 1405
	R ₂ C=CH ₂	3100 2975 1420 890	NO 2970 NO NO
	-COOH	3500-2500 banda ancha 1420-1200 1725-1700	3650-3370 banda ancha NO NO
EGDMA C ₁₀ H ₁₄ O ₄	RCOOR	1750-1735 1300-1165 dos bandas	1740 1261-1170
	R ₂ C=CH ₂	3100 2975 1420 890	NO 2970 NO NO

Se observa en el espectro de infrarrojo de la figura 1, correspondiente al polímero NIP, que las bandas que predominan en el espectro son las correspondientes al entrecruzador EGDMA, lo cual era de esperarse tomando en cuenta que el polímero tiene proporciones 1:4:20 de plantilla, monómero y entrecruzador respectivamente, es decir que por cada molécula de ácido metacrílico hay cinco de EGDMA. La banda del ácido carboxílico del ácido metacrílico, por ejemplo, no

esté presente en el espectro, sin embargo se puede pensar que se empalma con la señal del éster del entrecruzador y, al ser de menor intensidad, no se aprecia.

Por otra parte, observamos también que las bandas correspondientes al metileno terminal ($3100, 2975, 1420$ y 890cm^{-1}) no se encuentran en el espectro y esto se explica porque en la reacción de polimerización por radicales libres, un radical ataca al metileno terminal de tal forma que pueda unirse a otra molécula, ya sea de monómero o de entrecruzador. Al no encontrar las bandas corroboramos que la reacción por radicales libres se llevó a cabo tal como se esperaba.

2. MIP EGDMA CH4

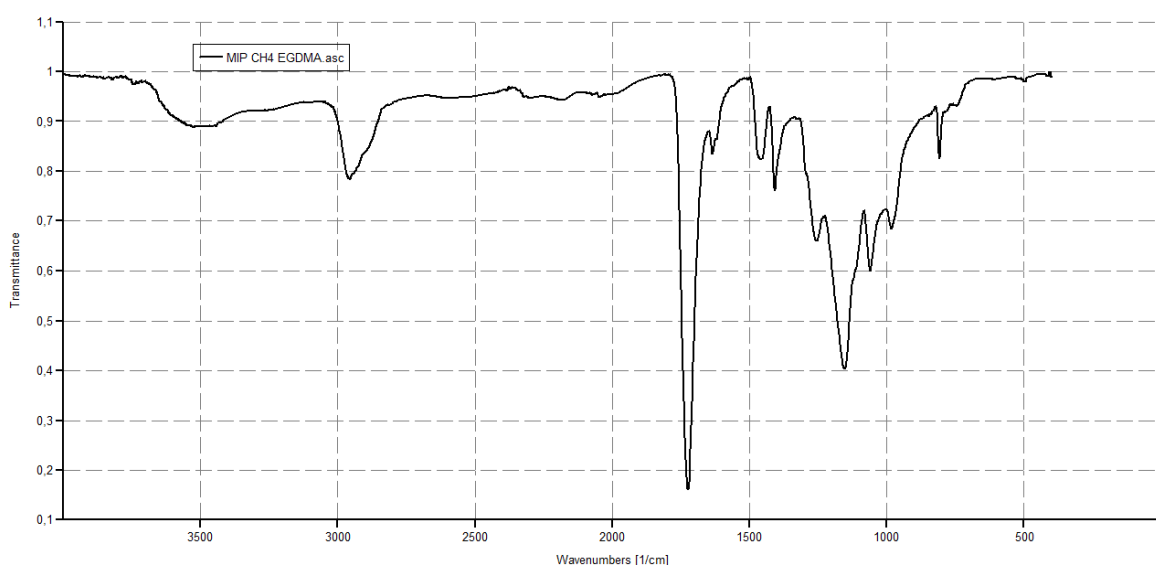


Figura 19. Espectro de infrarrojo del polímero de impronta MIP CH4 EGDMA

En el espectro de IR del polímero MIP CH4 EGDMA, espectro de infrarrojo 2, se esperan bandas correspondientes al entrecruzador, al igual que en el espectro de infrarrojo 1, no se esperan bandas correspondientes a la plantilla debido a que el polímero caracterizado fue lavado para retirar dicha plantilla.

Lo que se obtiene es un espectro muy parecido al del polímero sin impronta, debido a que ambos están hechos bajo las mismas condiciones y proporciones de monómero y entrecruzador. En este espectro no se encontró ninguna banda correspondiente a la plantilla y esto se explica por dos razones. Primero, porque el

polímero se lavó con la finalidad de retirar la plantilla, el espectro confirma que este paso se realizó correctamente. Además, debido a las proporciones de plantilla con respecto al monómero y al entrecruzador, hubiéramos observado bandas de muy baja intensidad.

3. MIP PETA CH4

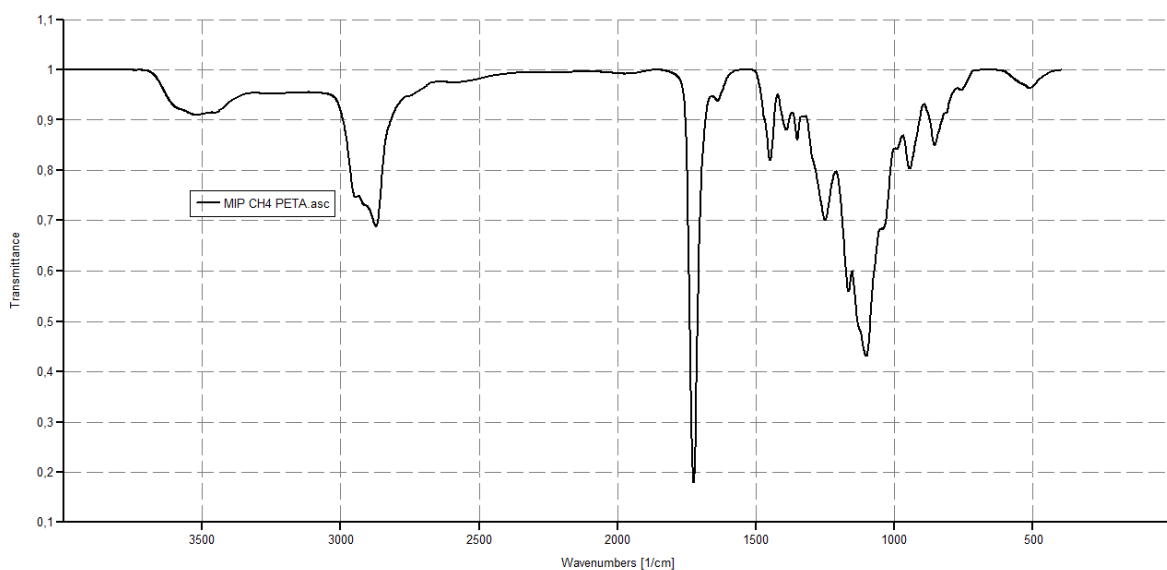


Figura 20. Espectro de infrarrojo del polímero de impronta MIP CH4 PETA

Para el polímero MIP CH4 PETA esperamos obtener aproximadamente las mismas bandas que para el polímero cuyo entrecruzador es EGDMA. Si analizamos las estructuras de estas dos especies, observamos que ambas tienen grupos éster y metilenos terminales, y la gran diferencia está en que el entrecruzador PETA tiene un grupo funcional alcohol.

Tabla 10. Resultados del espectro de IR para el polímero MIP CH4 PETA⁷⁷

Molécula	Grupos funcionales	Número de onda esperado (cm ⁻¹)	Número de onda encontrado (cm ⁻¹)
PETA C ₁₄ H ₂₁ O ₇	R-OH	3650-3200 1500-1300 1050 primario 650	3664-3345 1470 1053 NO
	R ₂ C=CH ₂	3100 2975 1420 890	NO 2930 NO 862
	RCOOR	1750-1735 1300-1165 dos bandas	1740 1181-1110

La molécula de entrecruzador PETA con respecto a la de EGDMA tiene un grupo éster adicional, en el espectro esto se ve reflejado en que las bandas que se encuentran entre 1300cm⁻¹ y 1165cm⁻¹ se ensanchan más. Además la molécula de PETA tiene un grupo alcohol que no tiene EGDMA, la banda de 3500cm⁻¹ es característica de -OH, aunque en el espectro de EGDMA también hay una banda de alcohol que proviene del ácido carboxílico del ácido metacrílico.

B. Polímeros covalentes

1. MIP Zn CH4 EGDMA

a) Antes del lavado

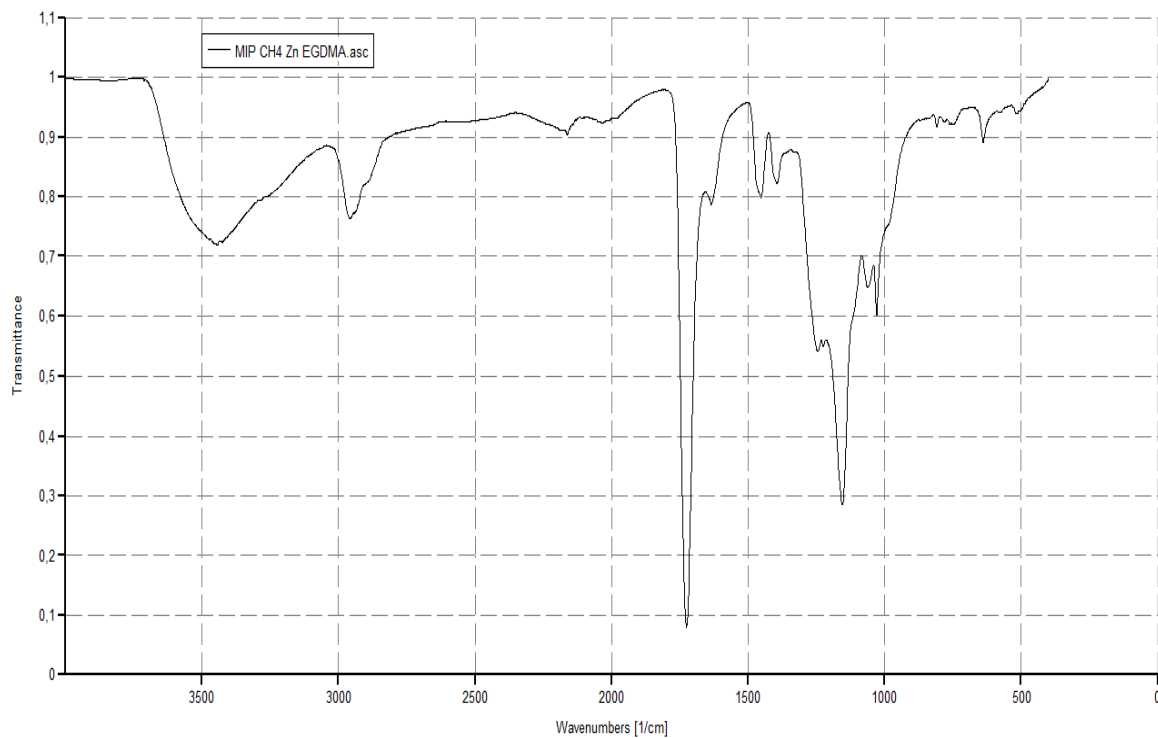


Figura 21. Espectro de infrarrojo del polímero de impronta MIP Zn CH4 EGDMA

Además de las bandas del entrecruzador EGDMA, esperamos para este polímero presente bandas características del monómero funcional, la 4-vinilpiridina.

Tabla 11. Resultados del espectro de IR para el polímero MIP Zn CH4 EGDMA⁷⁷

Molécula	Grupos funcionales	Número de onda esperado (cm ⁻¹)	Número de onda encontrado (cm ⁻¹)
4-vinilpiridina C ₇ H ₇ N	Piridina	3500	3450
		3080	2980
		1581	NO
		1450	NO
		1000-990	NO
		750-705	NO
		600	NO
	R ₂ C=CH ₂	3100	NO
		2975	2954
		1420	NO
		890	NO

Las bandas características de la piridina y del metileno terminal no se aprecian claramente en el espectro, y esto se debe nuevamente a la baja proporción de monómero funcional con respecto a la de entrecruzador, 1:5.

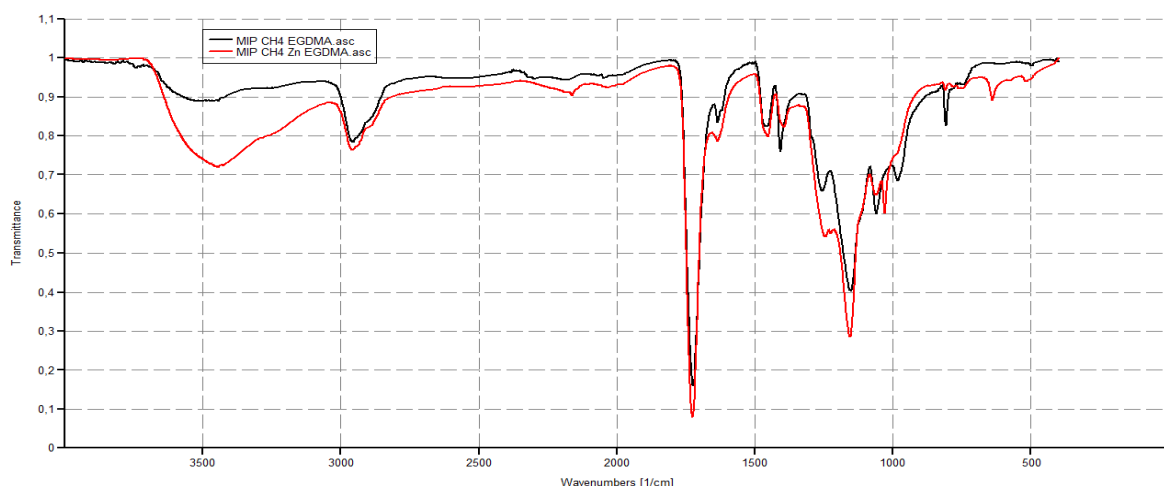


Figura 21.bis. Comparación de los espectros de infrarrojo de los polímeros MIP CH4 EGDMA y MIP Zn CH4 EGDMA

Observamos en el espectro comparativo (4.bis.) que esencialmente los espectros de los polímeros no covalente (en negro) y covalente (en rojo) son iguales. Los cambios se ubican en la zona alrededor de 3500cm^{-1} , la banda de 1250cm^{-1} que muestra mayor absorbancia para el polímero covalente y la banda de 812cm^{-1} que se desplaza hasta 640cm^{-1} en el polímero covalente.

El hecho de que los espectros de los polímeros sean tan parecidos entre sí se debe a que en la síntesis de ambos se utilizó el mismo entrecruzador y en la misma proporción, cinco veces mayor que el monómero funcional. Las bandas correspondientes a los ésteres están presentes en ambos espectros.

La banda de 3500cm^{-1} es característica de la piridina y el hecho de que la absorbancia sea grande puede ser una muestra experimental de la coordinación del nitrógeno con el ión metálico Zn^{2+} .

b) Después del lavado

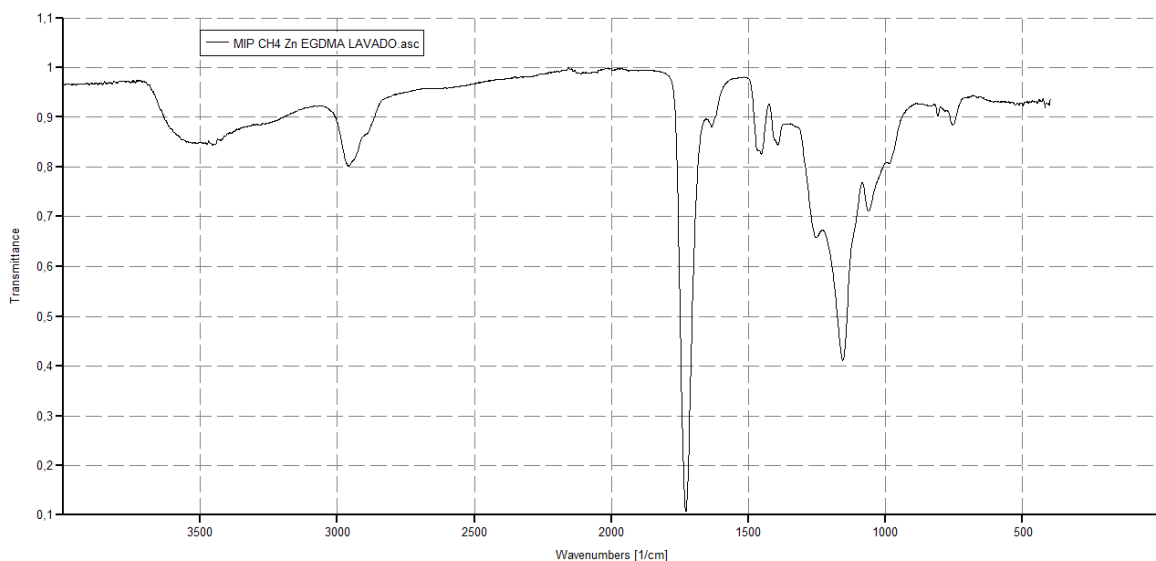


Figura 22. Espectro de infrarrojo del polímero de impronta MIP Zn CH4 EGDMA después del lavado.

Observamos que en este espectro, con respecto al anterior, la banda de 3500cm^{-1} disminuyó en absorbancia. El espectro del polímero covalente después del lavado es prácticamente el mismo que el espectro del polímero no covalente.

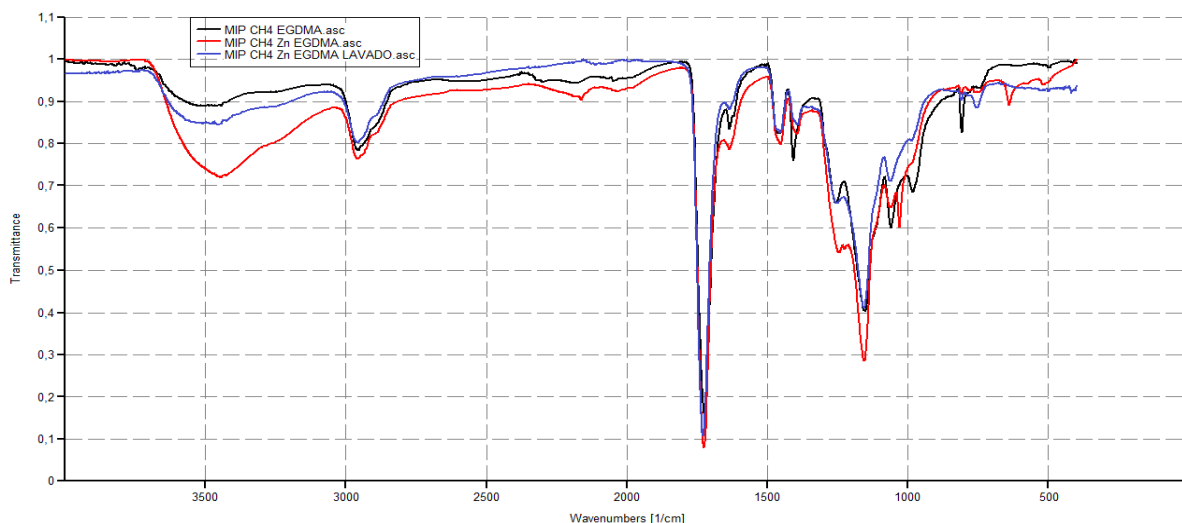


Figura 22.bis. Comparación de los espectros de infrarrojo de los polímeros MIP CH4 EGDMA (negro), MIP Zn CH4 EGDMA (rojo) y MIP Zn CH4 EGDMA después del lavado (azul).

La clara disminución en la banda de 3500cm^{-1} nos hace pensar que en el lavado se retiró tanto la plantilla como el ión metálico Zn^{2+} . Por su parte la piridina, responsable de dicha banda, sigue en la muestra tras el lavado. Esto fortalece la idea de que es la coordinación N-Zn la que provoca que el valor de absorbancia sea grande.

c) Después de la recuperación de zinc

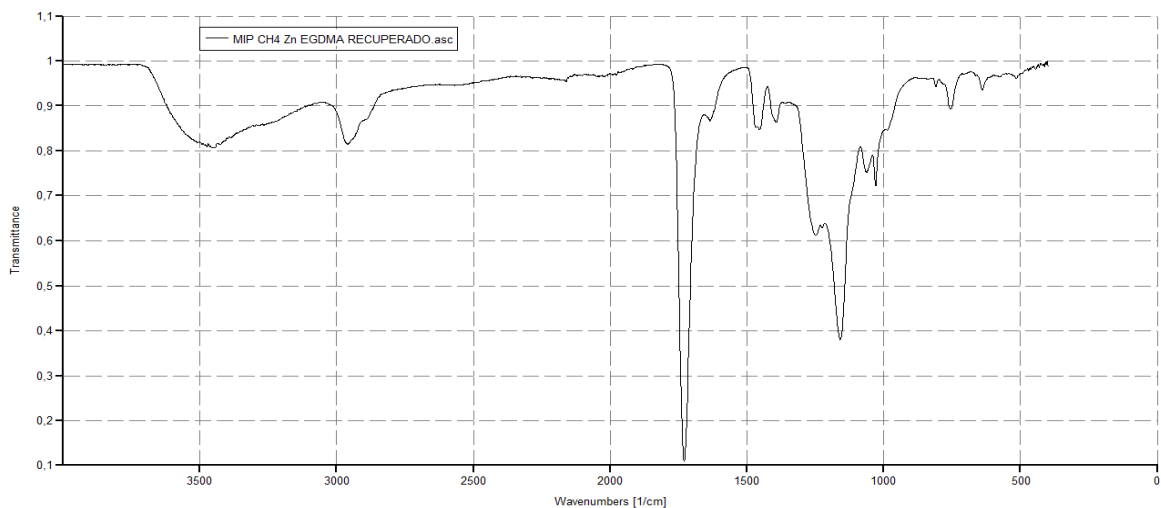


Figura 23. Espectro de infrarrojo del polímero de impronta MIP Zn CH4 EGDMA después del proceso de recuperación de Zn

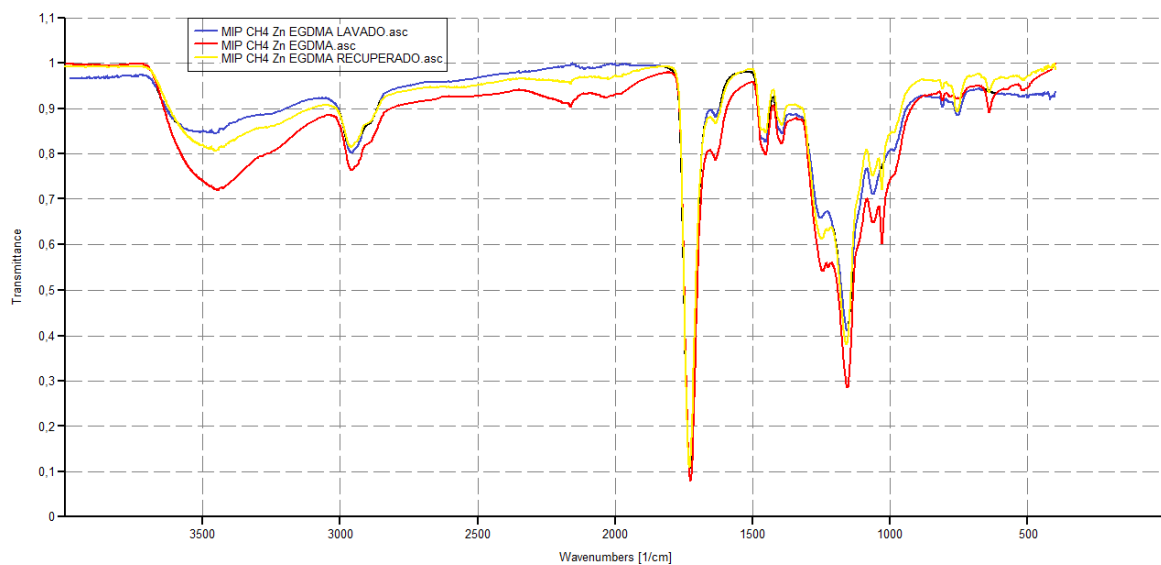


Figura 23.bis. Comparación de los espectros de infrarrojo de los polímeros MIP Zn CH4 EGDMA (rojo), MIP Zn CH4 EGDMA después del lavado (azul) y MIP Zn CH4 EGDMA (amarillo).

Observamos que tras el proceso de recuperación de Zn, la banda de 3500cm^{-1} vuelve a aumentar en absorbancia, lo que nos hace pensar que se ha formado de nuevo el compuesto de coordinación entre el metal y la piridina funcionalizada.⁷¹

d) Análisis elemental

El análisis elemental de las muestras de MIP Zn CH₄ EGDMA proporciona los siguientes resultados:

Tabla 12. Análisis elemental de los polímeros MIP Zn CH₄ EGDMA antes y después del lavado y tras la recuperación de Zn.

Polímero	Carbono	Hidrógeno	Nitrógeno
Antes del lavado	48.940%	6.230%	0.460%
Después del lavado	51.485%	5.980%	0.340%
Después de la recuperación	48.120%	5.943%	0.497%

Se puede observar en la tabla 12 que el porcentaje de carbono aumenta después del lavado y vuelve a disminuir después de la recuperación de zinc. Esto se explica porque en las muestras antes del lavado y después de la recuperación, hay zinc en el polímero, el zinc aporta cierta masa al compuesto y provoca que el porcentaje de las demás especies disminuya, mientras que en la muestra después del lavado, al no haber zinc presente, cada uno de los otros elementos tiene mayor porcentaje. Por su parte, las diferencias porcentuales entre las muestras antes del lavado y después de la recuperación del metal son del orden del error estándar (1.738 para carbono, 0.223 para hidrógeno y 0.060 para nitrógeno, para la muestra después de la recuperación) con lo cual se puede concluir que se recuperó todo el zinc.

Por lo tanto este experimento es un indicio de la presencia de zinc en el polímero MIP Zn CH₄ EGDMA que se utiliza en los experimentos de isoterma de enlace.

2. MIP Zn CC89

a) Antes del lavado

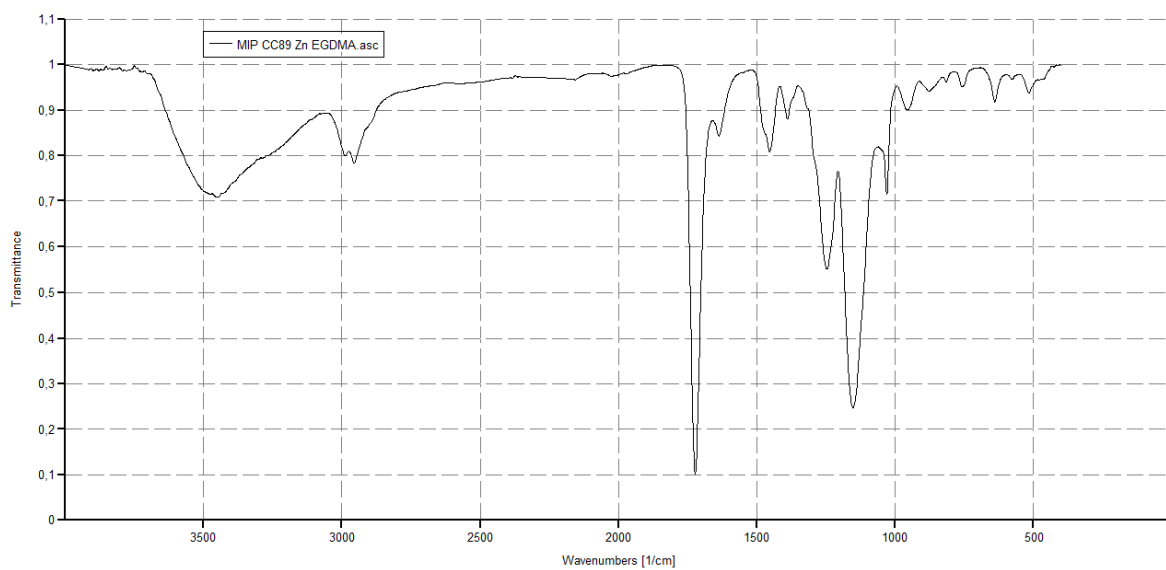


Figura 24. Espectro de infrarrojo del polímero de impronta MIP Zn CC89 EGDMA

b) Después del lavado

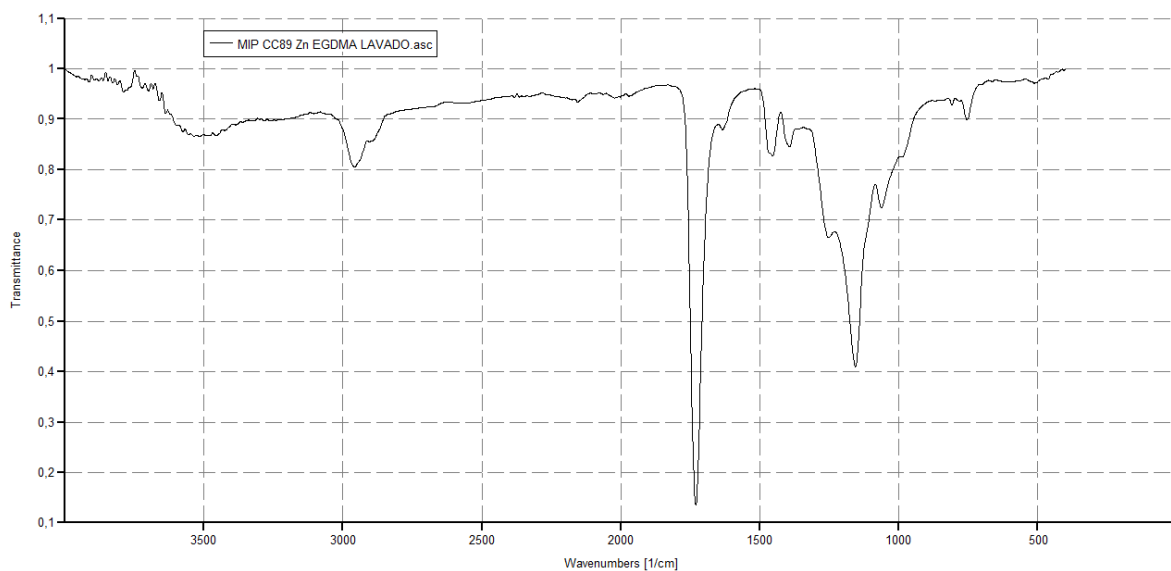


Figura 25. Espectro de infrarrojo del polímero de impronta MIP Zn CC89 EGDMA después del lavado

c) Después de la recuperación de zinc

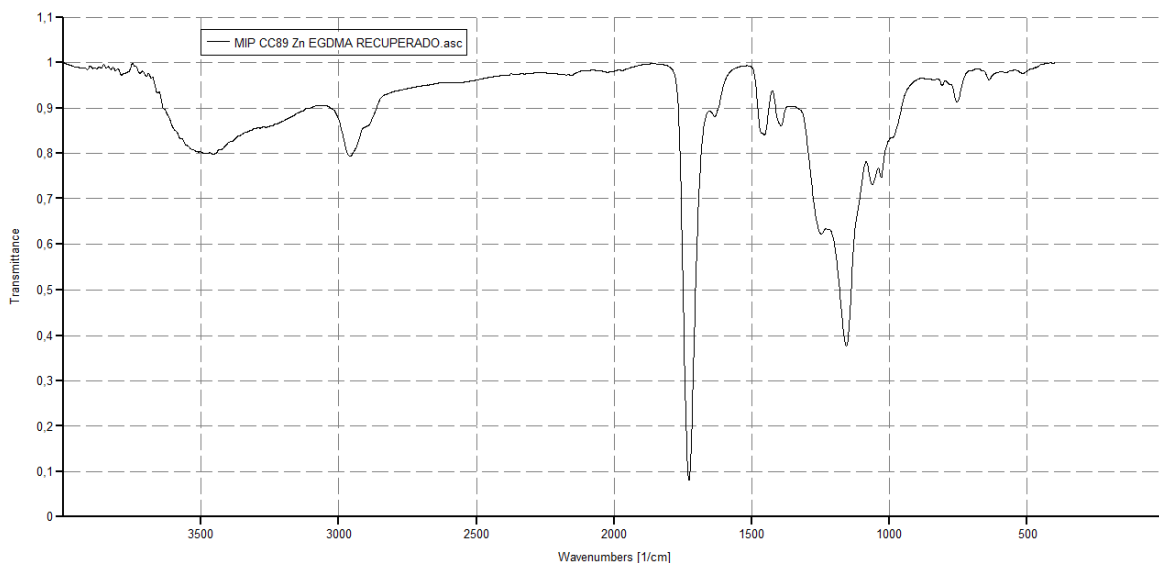


Figura 26. Espectro de infrarrojo del polímero de impronta MIP Zn CC89 EGDMA después del proceso de recuperación de Zn

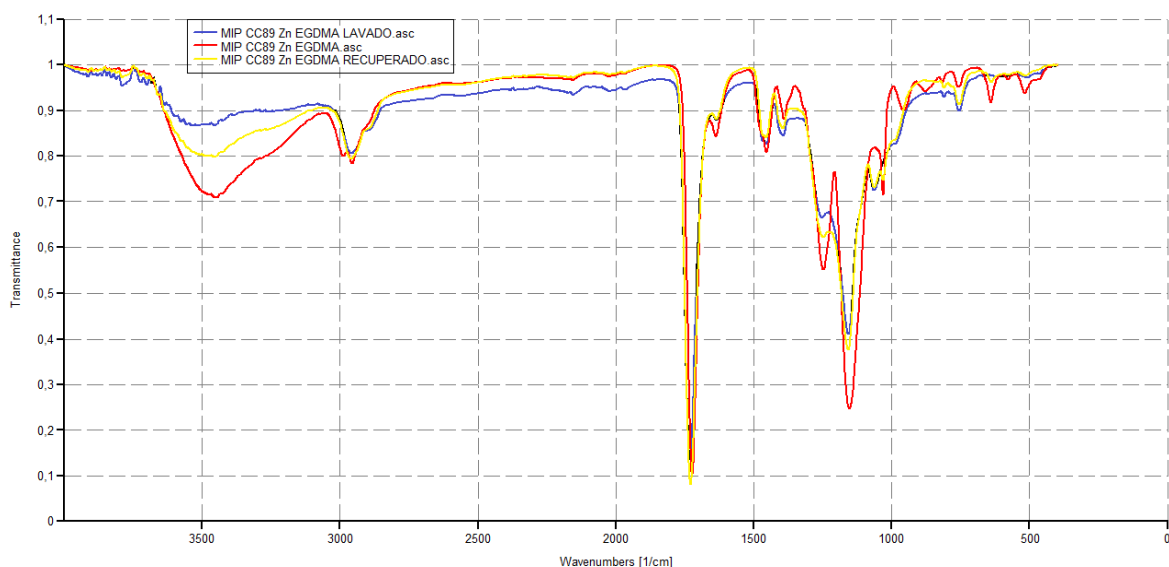


Figura 27. Comparación de los espectros de infrarrojo de los polímeros MIP Zn CC89 EGDMA (rojo), MIP Zn CC89 EGDMA después del lavado (azul) y MIP Zn CC89 EGDMA (amarillo).

Los espectros de los polímeros covalente moldeados con CC89 son prácticamente iguales que los polímeros covalentes moldeados con CH4 debido a que las

condiciones de síntesis fueron exactamente las mismas, sólo cambia la plantilla que está en muy baja proporción y que después del lavado se elimina.

Se observa, al igual que en el caso del análogo CH₄, que la banda alrededor de 3500 cm⁻¹ tiene mayor absorbancia en el polímero covalente, luego disminuye tras el lavado y finalmente después de la recuperación vuelve a aumentar, aunque no vuelve a tener la misma absorbancia que inicialmente. Esto se explica de la misma manera que en el caso anterior, el complejo se rompe durante el lavado y la alta absorbancia en la señal está asociada al enlace de coordinación Zn-N.⁷¹

d) Análisis elemental

El análisis elemental de las muestras de MIP Zn CC89 EGDMA proporciona los siguientes resultados:

Tabla 13. Análisis elemental de los polímeros MIP Zn CC89 EGDMA antes y después del lavado y tras la recuperación de Zn.

Polímero	Carbono	Hidrógeno	Nitrógeno
Antes del lavado	48.337%	6.537%	0.457%
Después del lavado	51.535%	5.935%	0.410%
Después de la recuperación	48.697%	5.697%	0.300%

Se puede observar en la tabla 13 que, al igual que para el análogo CH₄, el porcentaje de carbono aumenta después del lavado y vuelve a disminuir tras la recuperación de zinc y, como vimos antes, esto se debe a la presencia de zinc metálico. Las diferencias porcentuales entre las muestras antes del lavado y después de la recuperación del metal son del orden del error estándar (3.435 para carbono, 0.367 para hidrógeno y 0.159 para nitrógeno, para la muestra antes del lavado) con lo cual se puede pensar que se recuperó todo el zinc.

Por lo tanto, este experimento es un indicio de la presencia de zinc en el polímero MIP Zn CC89 EGDMA que se utiliza en los experimentos de isoterma de enlace.

C. Isotermas de enlace

1. Análogo CH₄

a) MIP CH₄ EGDMA

- Cloroformo

Para el primer experimento se realiza la curva de calibración del análogo CH₄ en cloroformo mediante la medición de concentración por cromatografía de gases. La curva de calibración consiste en realizar mediciones en el cromatógrafo de disoluciones de concentración conocida de plantilla, análogo CH₄. Después se dejan 5.0mL de muestra agitando cinco horas con 0.05g de polímero MIP CH₄ EGDMA y se vuelven a medir las disoluciones en el cromatógrafo. Se obtuvieron los siguientes resultados con un tiempo de retención de 7.7 minutos:

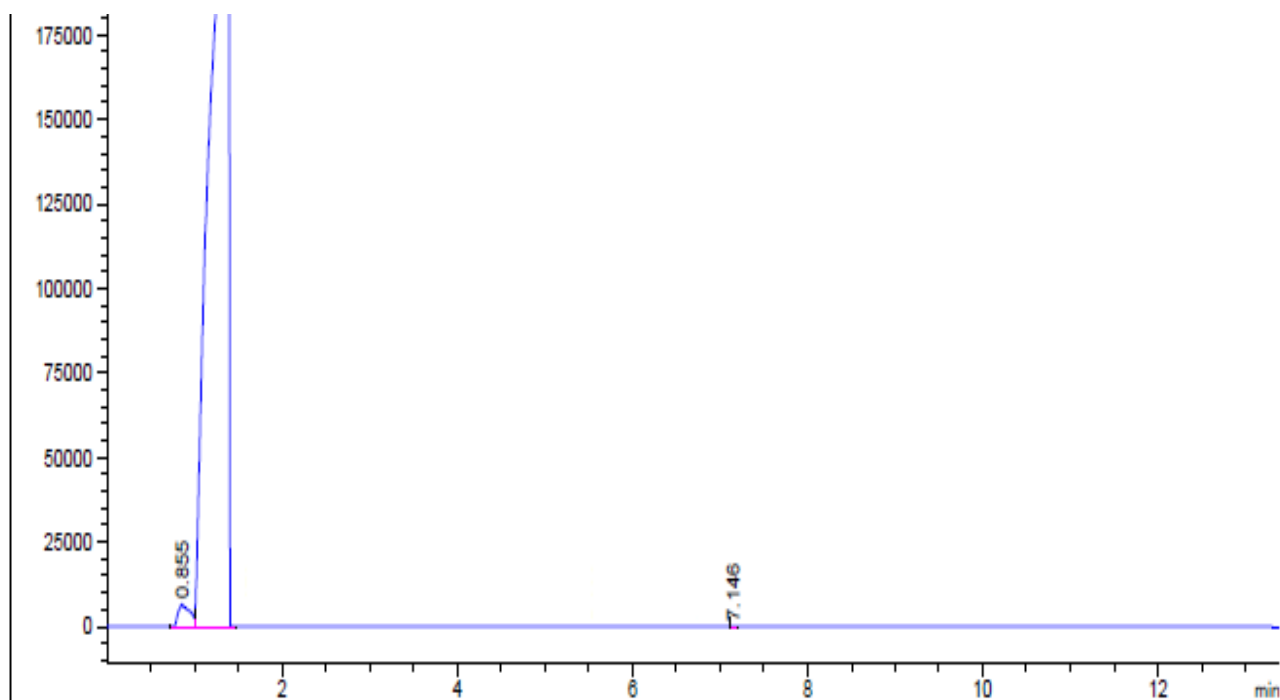


Figura 28. Cromatograma: blanco de cloroformo CHCl₃ HPLC

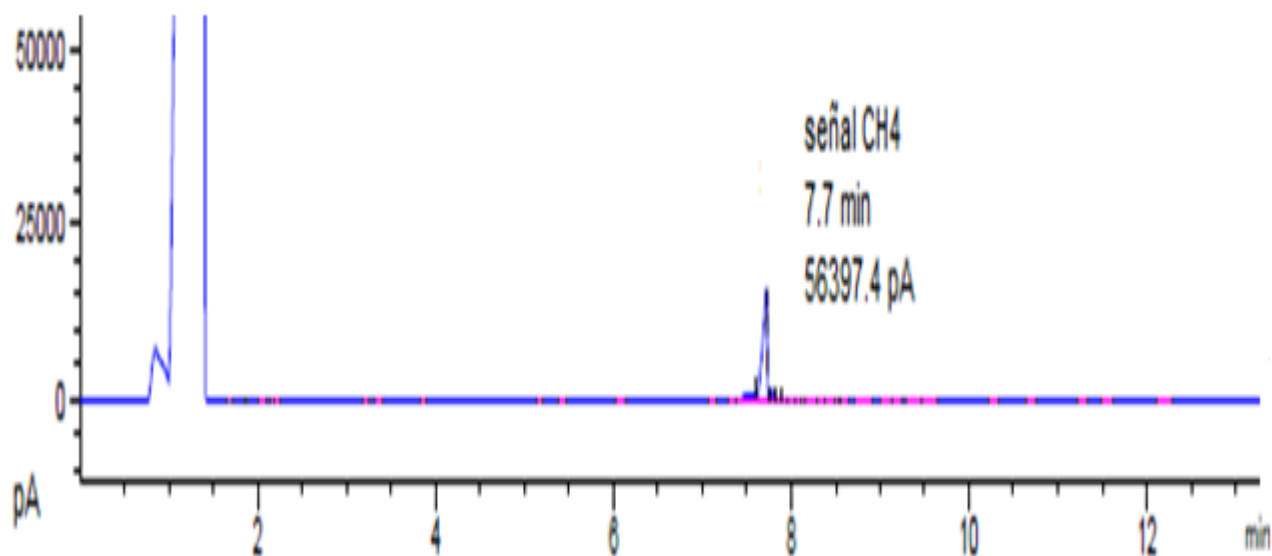


Figura 29. Cromatograma: CH₄ 1E-2 M en CHCl₃ HPLC (7.7min 56397.4 pA)

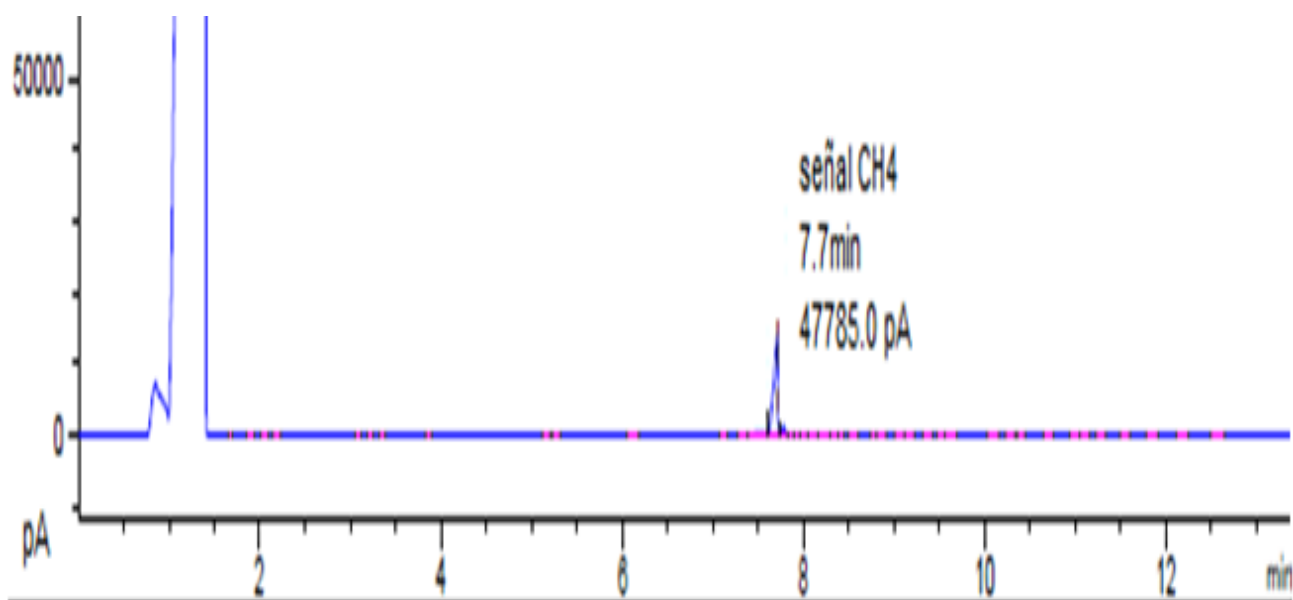


Figura 30. Cromatograma: CH₄ 1E-2 M en CHCl₃ HPLC MIP (masa de polímero: 0.05g; tiempo de agitación: 5h) (7.7min 47785.0 pA)

Tabla 14. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CH₄ en el polímero MIP CH₄ EGDMA en cloroformo

Ci (mol/L)	Área del pico (pA)	Área del pico tras MIP (0.05g 5h) (pA)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0	0	0
1.00E-02	56397.4	47785.0	8.47E-03	1.53E-03	15.27%
8.00E-03	46691.8	38950.1	6.67E-03	1.33E-03	16.58%
6.00E-03	32690.2	27376.1	5.02E-03	9.75E-04	16.26%
4.00E-03	29630.6	24013.6	3.24E-03	7.58E-04	18.96%
2.00E-03	13459.1	9468.2	1.41E-03	5.93E-04	29.65%

Ci: concentración inicial; Cf: concentración final; Cads: concentración adsorbida; %ads: porcentaje de adsorción

A partir de los resultados se realiza la isoterma de adsorción, concentración adsorbida (Cads) en función de la concentración inicial (Ci) y obtuvimos una correlación no lineal al modelo Langmuir-mono. Se intentó ajustar a otros modelos no lineales que explicaran el tipo de adsorción, como los mencionados en los antecedentes, sin embargo, el único ajuste aceptable se dio para este modelo:

Tabla 15. Resultados de la isoterma de adsorción del polímero MIP CH₄ EGDMA en cloroformo con el modelo de Langmuir.

	Qs		b		Estadística	
	Valor	Error estándar	Valor	Error estándar	Chi-cuadrada reducida	Ajuste R-cuadrada
Cads MIP EGDMA	0.0035	0.00112	74.3776	36.806	8.63E-09	0.97132

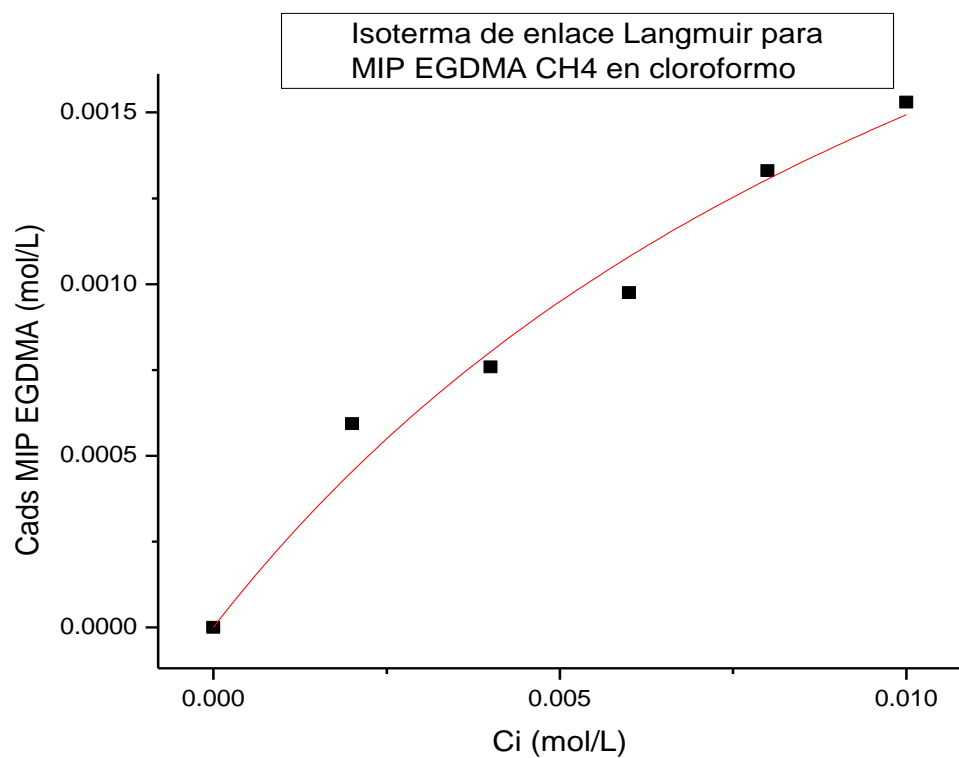


Figura 31. Gráfica de la isoterma de adsorción del polímero MIP CH4 EGDMA en cloroformo con el modelo de Langmuir

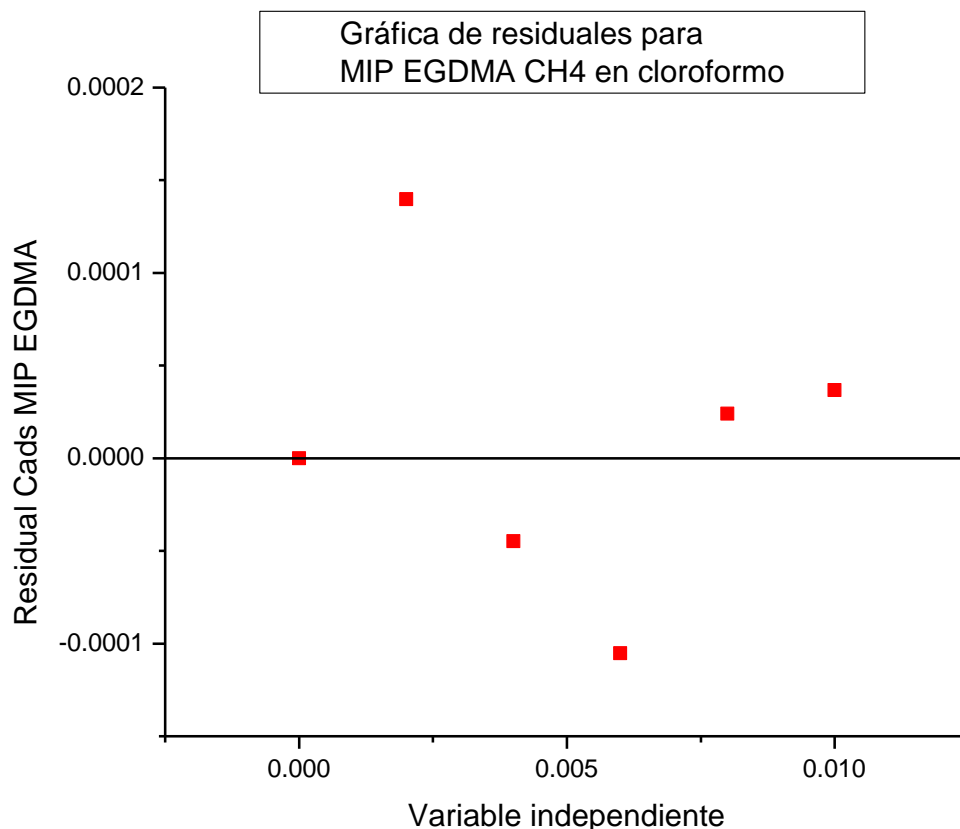


Figura 31.bis. Gráfica de residuales de la isoterma de adsorción del polímero MIP CH4 EGDMA en cloroformo con el modelo de Langmuir

El ajuste no lineal es bueno, 92% de correlación, y la gráfica de residuales indica una correcta distribución de los puntos. Bajo los supuestos que implica el modelo de Langmuir: sólo una plantilla se adsorbe por sitio, la adsorción de cada sitio es independiente y la adsorción ocurre en monocapas; el polímero MIP CH4 EGDMA en cloroformo, que sigue este comportamiento, tiene una constante de adsorción de 74.4 y 0.0035 sitios por unidad de área.⁷²

- Metanol

Para poder escoger el disolvente ideal para la adsorción del análogo CH4, se realizó un experimento en un disolvente más polar que el cloroformo, pero no demasiado polar como para poder inyectarlo en el cromatógrafo sin problemas. De ahí que se escogiera metanol. Los resultados, con tiempo de retención 7.7 son:

Tabla 16. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CH₄ en el polímero MIP CH₄ EGDMA en metanol

Ci (mol/L)	Área del pico (pA)	Área del pico tras MIP (0.05g 5h) (pA)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0	0	0
1.00E-02	44389.6	27125.0	6.11E-03	3.89E-03	38.89%
8.00E-03	33531.6	21260.7	5.07E-03	2.93E-03	36.60%
6.00E-03	22443.5	13733.4	3.67E-03	2.33E-03	38.81%
4.00E-03	14930.7	9226.3	2.47E-03	1.53E-03	38.21%
2.00E-03	7770.2	2652.8	6.83E-04	1.32E-03	65.86%

La isoterma de enlace en metanol se ajusta al modelo de Langmuir y es:

Tabla 17. Resultados de la isoterma de adsorción del polímero MIP CH₄ EGDMA en metanol con el modelo de Langmuir.

	qs		b		Estadística	
	Valor	Error estándar	Valor	Error estándar	Chi-cuadrada reducida	Ajuste R-cuadrada
Cads MIP EGDMA	0.00526	0.00127	132.224	60.874	5.01E-8	0.96019

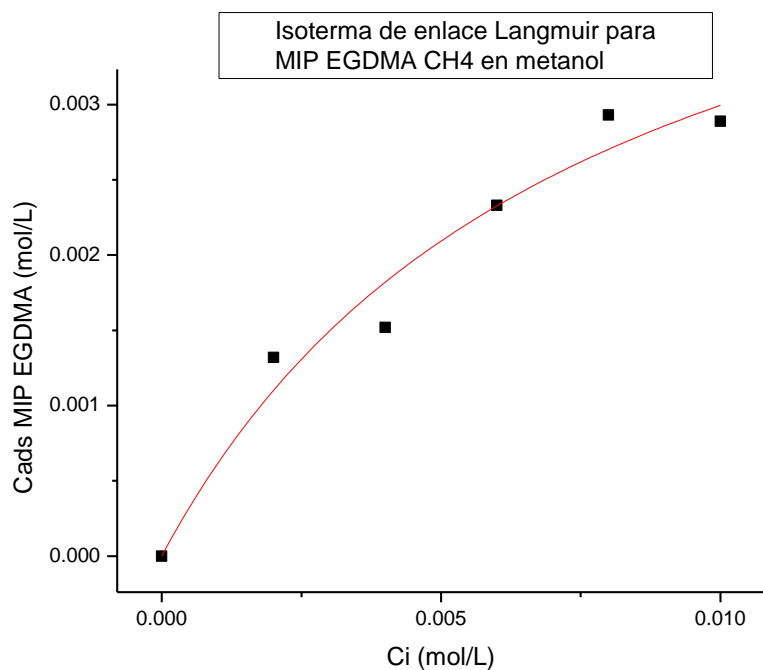


Figura 32. Gráfica de la isoterma de adsorción del polímero MIP CH4 EGDMA en metanol con el modelo de Langmuir

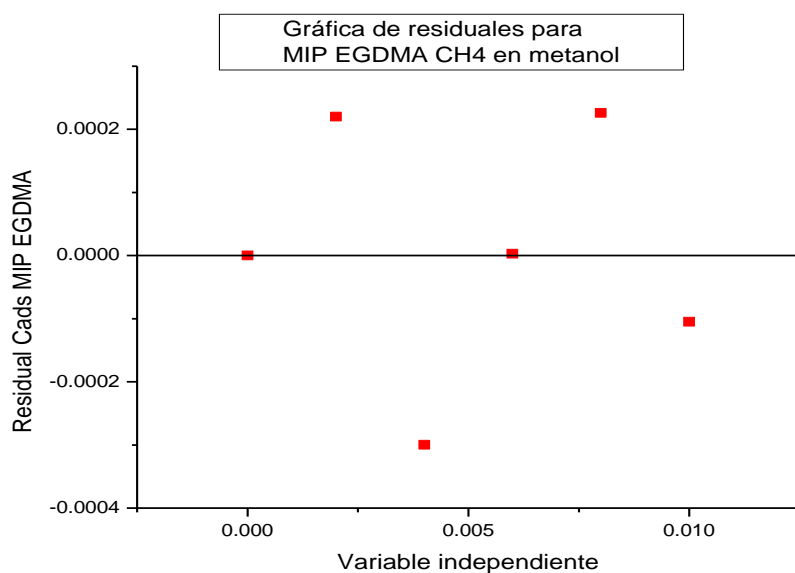


Figura 32.bis. Gráfica de residuales de la isoterma de adsorción del polímero MIP CH4 EGDMA en metanol con el modelo de Langmuir

En este caso, se obtiene de nuevo un ajuste bueno al modelo ideal de Langmuir, lo cual es lógico considerando que se trata del mismo polímero y que sólo se ha cambiado el disolvente. A pesar de obtener un ajuste de correlación menor, 88%, se observa que los valores de constante de adsorción y sitios de reconocimiento son mayores para el polímero MIP CH4 EGDMA en metanol (132.2 y 0.0053 respectivamente) que en cloroformo (74.4 y 0.0035 respectivamente). Esto se explica debido a que el análogo CH4 es una molécula poco polar. En presencia de un disolvente poco polar, como el cloroformo, existe una competencia entre el polímero y el disolvente por la plantilla, sin embargo en un disolvente polar, como el metanol, el disolvente excluye a las moléculas de plantilla hacia el polímero favoreciendo la adsorción.

b) NIP EGDMA

Con la finalidad de demostrar que la adsorción es mejor en un polímero de impronta que en un polímero sintetizado en las mismas condiciones pero sin impronta molecular, se realiza el siguiente experimento y los resultados obtenidos son:

Tabla 18. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CH4 en el polímero NIP EGDMA en metanol

Ci (mol/L)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0
1.00E-02	9.92E-03	7.63E-05	0.76%
8.00E-03	6.45E-03	1.55E-03	19.38%
6.00E-03	5.57E-03	4.31E-04	7.18%
4.00E-03	3.73E-03	2.74E-04	6.85%
2.00E-03	1.47E-03	5.25E-04	26.26%

No se obtuvo una isoterma de enlace para el polímero sin impronta NIP EGDMA debido a que ningún modelo de adsorción planteado se ajusta a los datos

obtenidos como para poder explicar el comportamiento de dichos datos. Con lo cual se deduce que la adsorción es mejor en un polímero de impronta molecular que en un polímero sin impronta. Esto se explica porque en el polímero de impronta hay muchos más sitios de reconocimiento con geometría y propiedades químicas afines a la plantilla que en el polímero sin impronta.⁷²

c) MIP CH₄ PETA

El siguiente experimento se realiza de la misma forma que el primero en metanol, sin embargo, se usa un polímero cuyo entrecruzador es diferente, PETA en lugar de EGDMA, para poder comparar la efectividad de adsorción de los polímeros en función de la distancia que separa cada hueco específico y el entrecruzamiento del polímero, ya que el PETA genera polímeros mucho más entrecruzados con respecto a EGDMA. Los resultados son:

Tabla 19. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CH₄ en el polímero MIP CH₄ PETA en metanol

Ci (mol/L)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0
1.00E-02	9.37E-03	6.35E-04	6.35%
8.00E-03	7.26E-03	7.36E-04	9.20%
6.00E-03	5.43E-03	5.69E-04	9.49%
4.00E-03	3.30E-03	7.01E-04	17.53%
2.00E-03	7.18E-04	1.28E-03	64.09%

No se obtuvo una isoterma de enlace para el polímero de impronta molecular MIP CH₄ PETA debido a que los datos obtenidos no se ajustan a modelos que expliquen el tipo de interacciones que se espera que ocurran. El entrecruzador PETA es más largo que el EGDMA, por lo tanto se esperaría que la distancia entre un sitio de reconocimiento y otro sea grande y que se favorezca la condición ideal de Langmuir, en la cual la adsorción en dos sitios diferentes es independiente. Sin

embargo, lo que se obtiene es que el análogo CH₄ no se adsorbe favorablemente en el polímero MIP CH₄ PETA. Esto se explica debido a que PETA, al ser un entrecruzador con un grupo éster de más, tiene un grado de entrecruzamiento mayor que EGDMA y esto puede haber derivado en la formación de una mayor cantidad de sitios de reconocimiento no específicos, micrositos o sitios colapsados. Difícilmente se pudieron haber formado sitios cluster debido a que la naturaleza del entrecruzador provoca que los sitios se separen unos de otros.⁷¹ Sin embargo, a pesar de no obtener una isoterma de enlace, el porcentaje de adsorción para bajas concentraciones del análogo de tricoteceno CH₄ es muy bueno, 64%, lo que significa que el polímero es útil para condiciones de baja concentración de plantilla.

d) MIP CH₄ Zn EGDMA

El último experimento se realiza con el complejo de impronta molecular con zinc en metanol. Los resultados fueron:

Tabla 20. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CH₄ en el polímero MIP CH₄ Zn EGDMA en metanol

Ci (mol/L)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0
1.00E-02	7.19E-03	2.81E-03	28.13%
8.00E-03	5.18E-03	2.82E-03	35.30%
6.00E-03	3.24E-03	2.76E-03	46.05%
4.00E-03	1.86E-03	2.14E-03	53.49%
2.00E-03	7.22E-04	1.28E-03	63.89%

La isoterma de enlace obtenida se ajusta al modelo Langmuir-Freundlich y es:

Tabla 21. Resultados de la isoterma de adsorción del polímero MIP CH4 Zn EGDMA en metanol con el modelo de Langmuir-Freundlich.

	N		K		m		Estadística		
	Valor	Error estándar	Valor	Erros estándar	Valor	Error estándar	Chi-cuadrada reducida	Ajuste R-cuadrada	
Cads MIP Zn	0.00306	1.995E-04	416.53	39.12	1.97507	0.445	1.15E-08	0.99109	

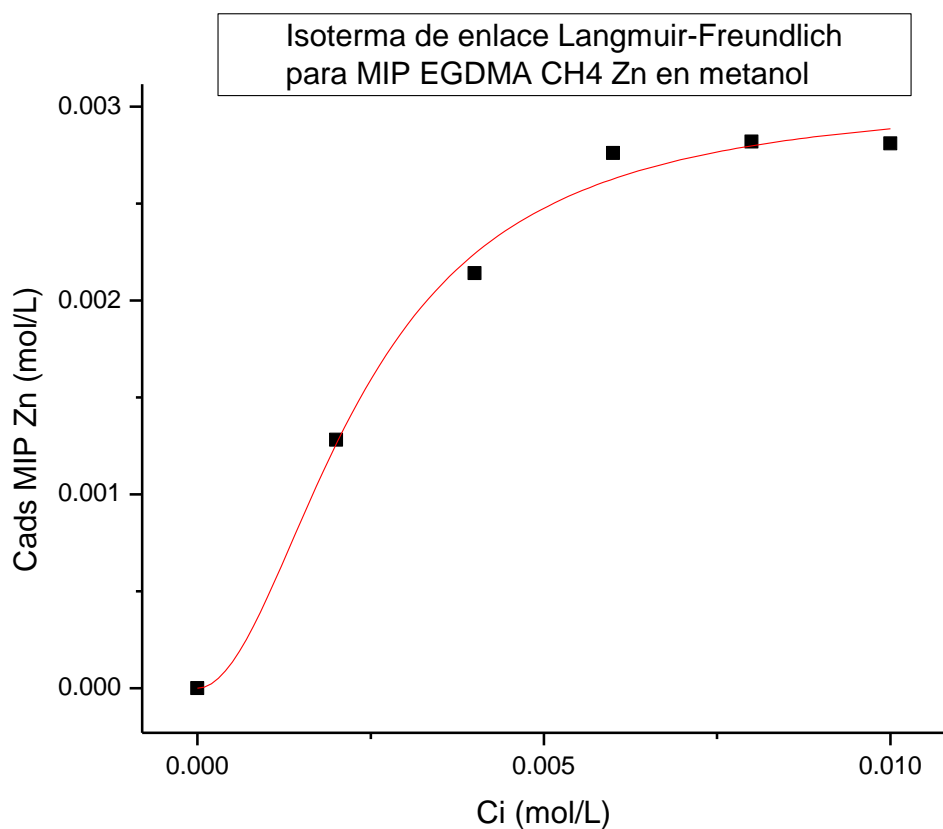


Figura 33. Gráfica de la isoterma de adsorción del polímero MIP CH4 Zn EGDMA en metanol con el modelo de Langmuir-Freundlich

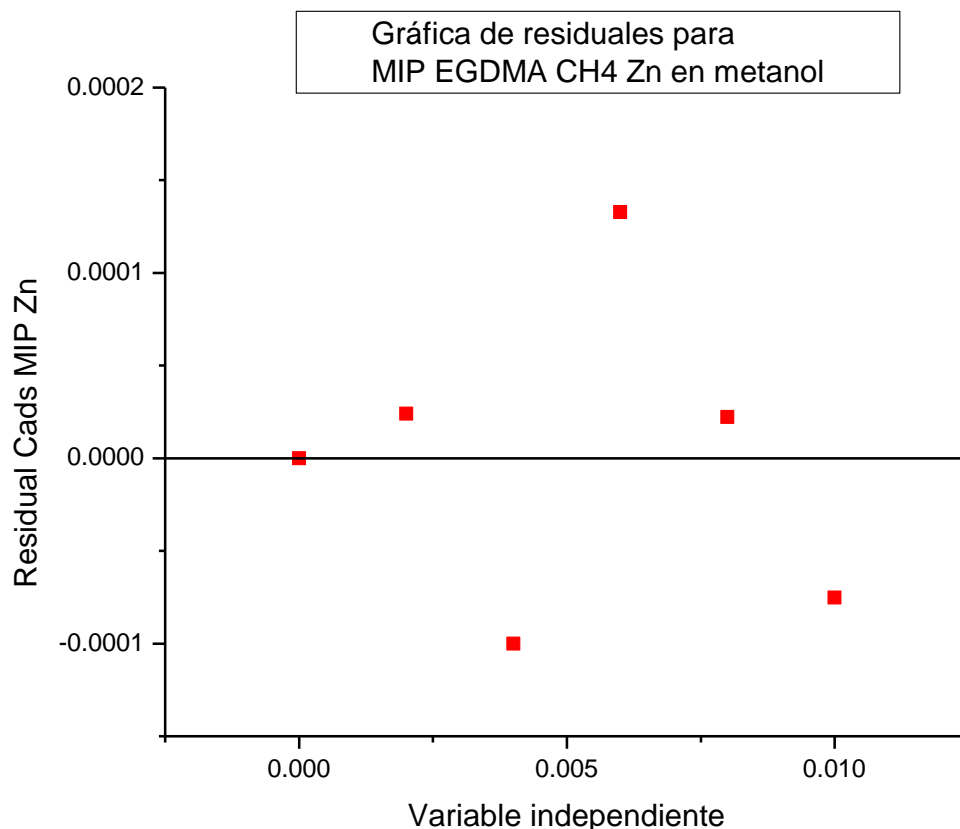


Figura 33.bis. Gráfica de residuales de la isoterma de adsorción del polímero MIP CH4 Zn EGDMA en metanol con el modelo de Langmuir-Freundlich

Para el polímero MIP CH4 Zn EGDMA se encontró que se comporta según el modelo híbrido de Langmuir-Freundlich con un ajuste no lineal muy bueno, 96% de correlación. Además de que el polímero se comporta de manera más realista, el valor de la constante es cuatro veces mayor que en el polímero no covalente, y aunque el número de sitios de reconocimiento disminuye 40%, probablemente debido a los procesos de lavado y recuperación de metal, la adsorción sigue siendo mejor con este polímero. Se puede entonces pensar que la plantilla, el análogo CH4, que es una débil base de Lewis forma un complejo de coordinación con zinc y con 4-vinilpiridina, o bien una interacción lo suficientemente fuerte como

para que se provoque que la adsorción sea mayor y más eficiente.⁷¹

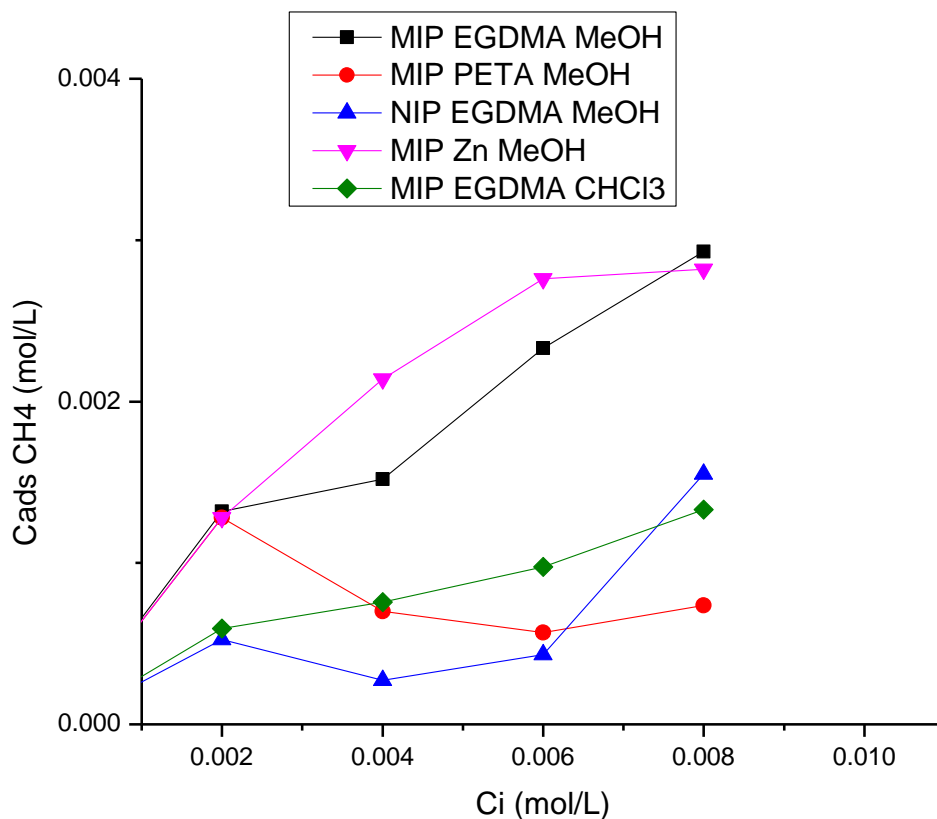


Figura 34. Resumen de las gráficas de las isotermas de enlace para el análogo CH4

2. Análogo CC89

a) MIP CC89 EGDMA

- Cloroformo

Para el primer experimento se realizó la curva de calibración del análogo CC89 en cloroformo y de forma análoga a lo realizado con el CH4, se dejó la muestra agitando cinco horas con el polímero MIP CC89 EGDMA y se volvieron a medir las disoluciones en el cromatógrafo. Se obtuvieron los siguientes resultados con un tiempo de retención de 6.6 minutos:

Tabla 22. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CC89 en el polímero MIP CC89 EGDMA en cloroformo

Ci (mol/L)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0
1.00E-02	7.10E-03	2.90E-03	29.03%
8.00E-03	5.50E-03	2.50E-03	31.27%
6.00E-03	4.00E-03	2.00E-03	33.27%
4.00E-03	2.54E-03	1.46E-03	36.50%
2.00E-03	1.30E-03	7.00E-04	34.98%

A partir de los resultados se realiza la isoterma de adsorción, concentración adsorbida (Cads) en función de la concentración inicial (Ci) y se ajusta al modelo de Langmuir-Freundlich. A pesar de que el polímero se ajusta también a otros modelos, entre ellos el de Langmuir sencillo, este modelo mostró un mejor ajuste y además es un modelo menos ideal en cuanto a las interacciones que explica que el de Langmuir sencillo:

Tabla 23. Resultados de la isoterma de adsorción del polímero MIP CC89 EGDMA en cloroformo con el modelo de Langmuir-Freundlich.

	N		K		M		Estadística	
	Valor	Error estándar	Valor	Error estándar	Valor	Error estándar	Chi-cuadrada reducida	Ajuste R-cuadrada
Cads MIP Zn	0.00577	6.88E-04	100.58	19.0302	1.21956	0.07657	5.78E-10	0.99952

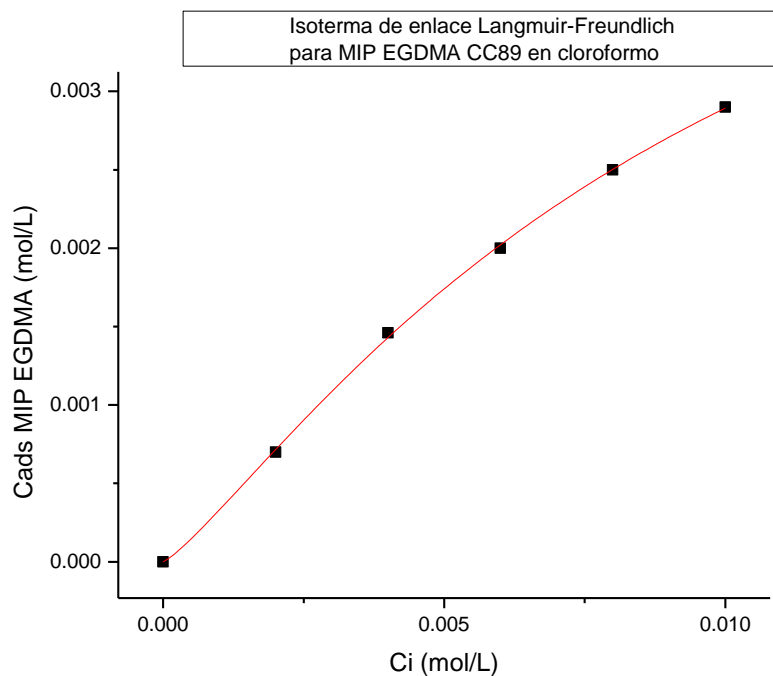


Figura 35. Gráfica de la isoterma de adsorción del polímero MIP CC89 EGDMA en cloroformo con el modelo de Langmuir-Freundlich

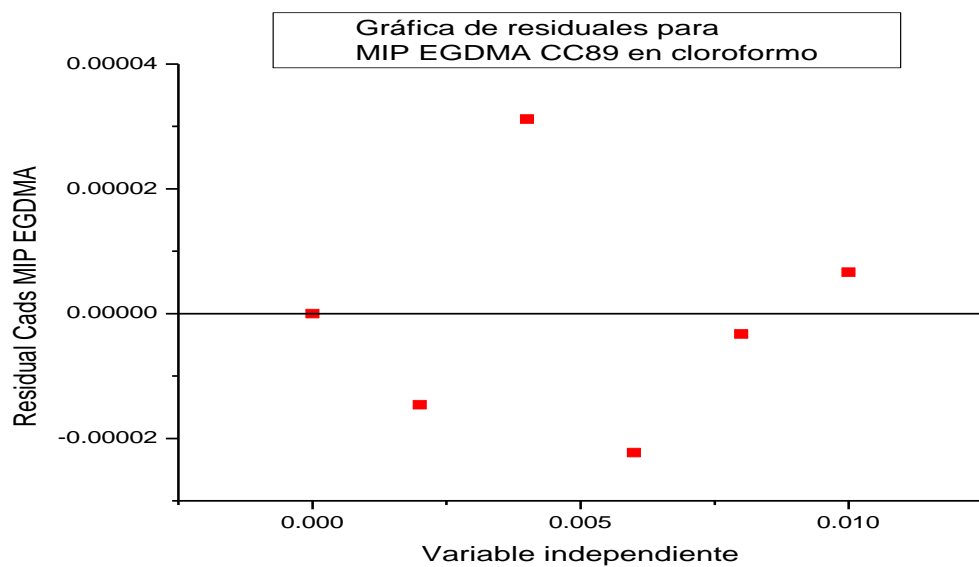


Figura 35.bis. Gráfica de residuales de la isoterma de adsorción del polímero MIP CC89 EGDMA en cloroformo con el modelo de Langmuir-Freundlich

Se observa que el polímero MIP CC89 EGDMA en cloroformo se comporta según el modelo de Langmuir-Freundlich y tiene un ajuste no lineal con 99% de correlación. El valor de la constante de adsorción es 100.58.

- Metanol

Para poder escoger el disolvente ideal para la adsorción del análogo CC89, se realizó un experimento en un disolvente de distinta polaridad. Los resultados en metanol, con tiempo de retención 6.6, son:

Tabla 24. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CC89 en el polímero MIP CC89 EGDMA en metanol

Ci (mol/L)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0
1.00E-02	8.89E-03	1.11E-03	11.12%
8.00E-03	7.01E-03	9.90E-04	12.37%
6.00E-03	5.11E-03	8.93E-04	14.88%
4.00E-03	3.30E-03	7.00E-04	17.50%
2.00E-03	1.80E-3	2.00E-04	10.00%

La isoterma de adsorción en metanol se ajusta también al modelo Langmuir-Freundlich:

Tabla 25. Resultados de la isoterma de adsorción del polímero MIP CC89 EGDMA en metanol con el modelo de Langmuir-Freundlich.

	N		K		M		Estadística	
	Valor	Error estándar	Valor	Error estándar	Valor	Error estándar	Chi-cuadrada reducida	Ajuste R-cuadrada
Cads MIP Zn	0.00113	5.35-5	288.88	17.704	2.64115	0.35067	1.187E-9	0.99409

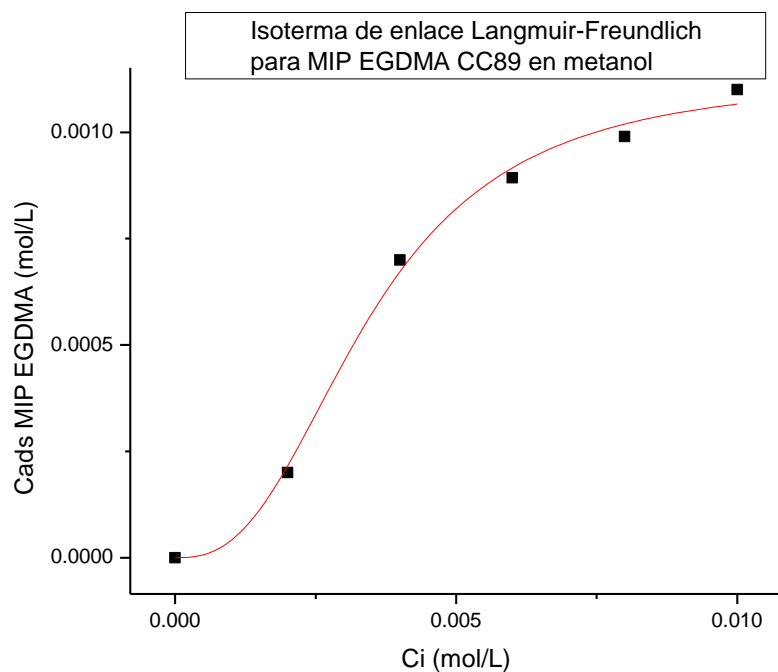


Figura 36. Gráfica de la isoterma de adsorción del polímero MIP CC89 EGDMA en metanol con el modelo de Langmuir-Freundlich

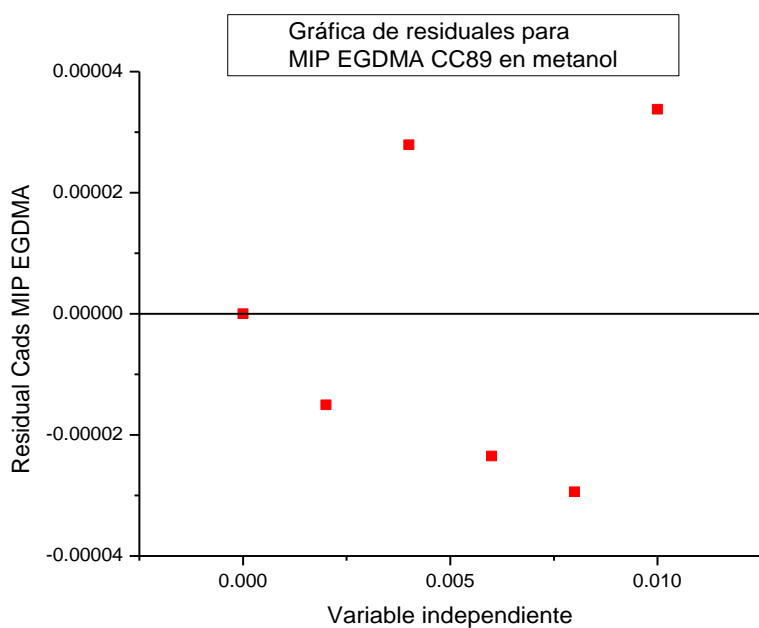


Figura 36.bis. Gráfica de residuales de la isoterma de adsorción del polímero MIP CC89 EGDMA en metanol con el modelo de Langmuir-Freundlich

En este caso, se obtiene de nuevo un ajuste bueno, 99%, al modelo híbrido de Langmuir-Freundlich, lo cual es lógico ya que sólo se varió el medio de reacción. Se observa que el valor de la constante de adsorción es casi tres veces mayor en metanol que en cloroformo, sin embargo hay muchos más sitios de reconocimiento activos, del orden de cinco veces más, al utilizar cloroformo como disolvente. Esto se explica debido a que el análogo CC89 es una molécula polar. En presencia de un disolvente polar, como el metanol, existe una competencia entre el polímero y el disolvente por la plantilla, sin embargo en un disolvente como el cloroformo, menos polar, el disolvente interacciona más probablemente con la plantilla y predominan las interacciones plantilla-polímero, esto hace que el polímero adsorba más fuertemente al análogo. Este fenómeno es conocido como efecto hidrofóbico.⁷⁸ Por lo tanto el disolvente escogido para los siguientes experimentos con la horma CC89 es cloroformo.

b) NIP EGDMA

Se realiza el siguiente experimento con el polímero sin impronta molecular en cloroformo, con los siguientes resultados:

Tabla 26. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CC89 en el polímero NIP EGDMA en cloroformo

Ci (mol/L)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0
1.00E-02	7.57E-03	2.43E-03	24.31%
8.00E-03	6.64E-03	1.36E-03	16.97%
6.00E-03	4.98E-03	1.02E-03	16.98%
4.00E-03	3.38E-03	6.23E-04	15.57%
2.00E-03	1.86E-03	1.39E-04	6.94%

No se obtuvo una isoterma de enlace para el polímero sin impronta molecular, debido a que los datos obtenidos no se ajustan a ningún modelo que explique los

procesos de adsorción. Esto nos indica que la adsorción del análogo CC89 se lleva a cabo más eficientemente y en mayor cantidad en polímeros de impronta, lo cual es acorde con lo esperado teóricamente.

c) MIP CC89 PETA

El siguiente experimento se realizó de la misma forma que el primero en cloroformo, sin embargo se usó un polímero cuyo entrecruzador es PETA. Los resultados son:

Tabla 27. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CC89 en el polímero MIP CC89 PETA en cloroformo

Ci (mol/L)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0
1.00E-02	8.91E-03	1.09E-03	10.90%
8.00E-03	6.79E-03	1.21E-03	15.09%
6.00E-03	4.71E-03	1.29E-03	21.43%
4.00E-03	2.73E-03	1.27E-03	31.67%
2.00E-03	1.06E-03	9.39E-04	46.95%

No se obtuvo una isoterma de enlace para el polímero de impronta molecular MIP CC89 PETA. Esto se explica de la misma forma que para el análogo CH4.

d) MIP CC89 Zn EGDMA

El último experimento se realizó con el complejo de impronta molecular con zinc en cloroformo. Los resultados son:

Tabla 28. Resultados de concentración obtenidos a partir de los cromatogramas de la adsorción de CC89 en el polímero MIP CC89 Zn EGDMA en cloroformo

Ci (mol/L)	Cf (mol/L)	Cads (mol/L)	%ads
0	0	0	0
1.00E-02	5.65E-03	4.35E-03	43.51%
8.00E-03	3.92E-03	4.08E-03	51.00%
6.00E-03	2.04E-03	3.96E-03	65.94%
4.00E-03	1.69E-03	2.31E-03	57.87%
2.00E-03	5.49E-04	1.45E-03	72.53%

Con este polímero se obtuvo el mayor porcentaje de adsorción, 72.53%, lo que representa que harían falta cuatro extracciones sucesivas para una adsorción cuantitativa (99%).

La isoterma de enlace para el polímero covalente MIP CC89 Zn EGDMA se ajusta al modelo Langmuir-Freundlich:

Tabla 29. Resultados de la isoterma de adsorción del polímero MIP CC89 Zn EGDMA en cloroformo con el modelo de Langmuir-Freundlich.

	N		K		M		Estadística	
	Valor	Error estándar	Valor	Error estándar	Valor	Error estándar	Chi-cuadrada reducida	Ajuste R-cuadrada
Cads MIP Zn	0.00552	0.00162	241.7995	106.436	1.61385	0.70493	1.097E-7	0.96397

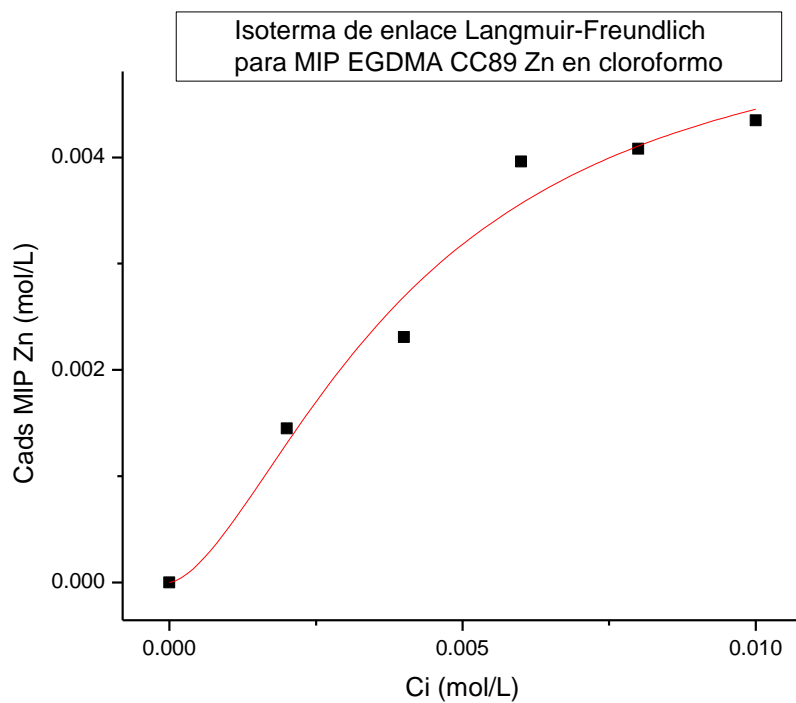


Figura 37. Gráfica de la isoterma de adsorción del polímero MIP CC89 Zn EGDMA en cloroformo con el modelo de Langmuir-Freundlich

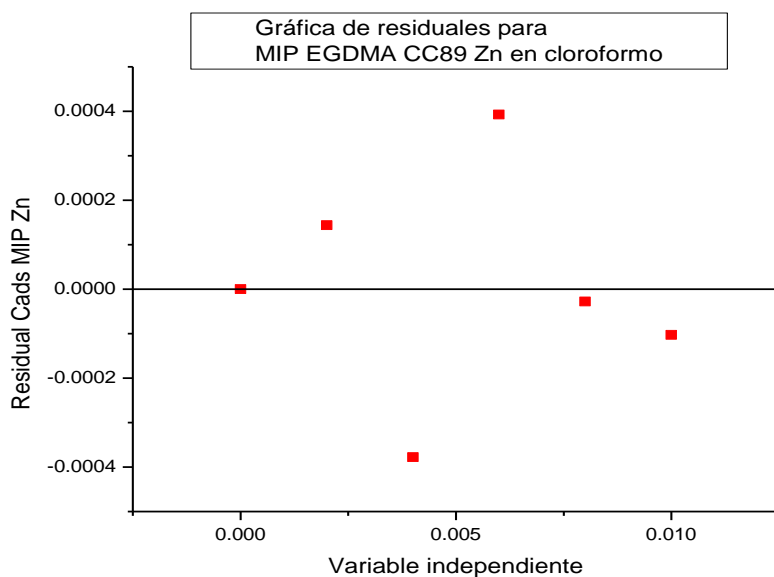


Figura 37.bis. Gráfica de residuales de la isoterma de adsorción del polímero MIP CC89 Zn EGDMA en cloroformo con el modelo de Langmuir-Freundlich

Finalmente, para el polímero de impronta covalente con el análogo CC89 en cloroformo, el ajuste no lineal al modelo de Langmuir-Freundlich es bueno, ya que su correlación es mayor de 96%, a pesar de ser menor que la correlación de los polímeros no covalentes, 99%. Se tiene un valor de constante de adsorción de alrededor del doble que para el caso del polímero no covalente y el número de sitios de reconocimiento activos se mantiene prácticamente igual. Esto invita a pensar que la formación del complejo entre el análogo, el metal y la 4-vinilpiridina ocurre y favorece la adsorción de la horma en el polímero.

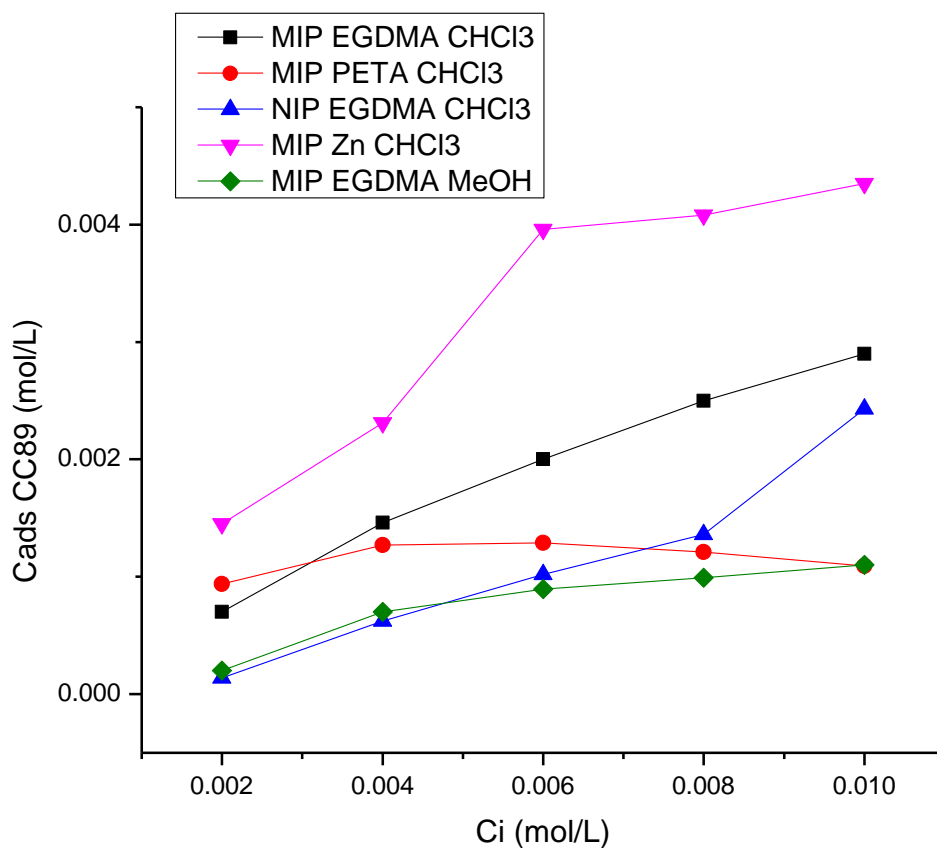


Figura 38. Resumen de las gráficas de las isoterma de enlace para el análogo CC89

3. Resumen

En la tabla 30 se muestra un resumen de los resultados obtenidos:

Tabla 30. Resumen de los resultados de las isothermas de adsorción para los diferentes polímeros.

Polímero	Disolvente	Tipo de ajuste	Valor de K	Valor de N
MIP EGDMA CH4	CHCl ₃	Langmuir-mono	74.4	0.00350
MIP EGDMA CH4	MeOH	Langmuir-mono	132.2	0.00526
NIP EGDMA CH4	MeOH	No		
MIP PETA CH4	MeOH	No		
MIP Zn CH4	MeOH	Langmuir-Freundlich	416.5	0.00306
MIP EGDMA CC89	CHCl ₃	Langmuir-Freundlich	100.6	0.00577
MIP EGDMA CC89	MeOH	Langmuir-Freundlich	288.9	0.00113
NIP EGDMA CC89	CHCl ₃	Lineal		
MIP PETA CC89	CHCl ₃	No		
MIP Zn CC89	CHCl ₃	Langmuir-Freundlich	241.8	0.00552

Donde K es la constante de adsorción y N es el número de centros activos por unidad de volumen.

Se puede concluir de la tabla precedente que los polímeros de impronta molecular covalente, que formalmente serían polímeros de impronta molecular de coordinación, son más eficientes para la adsorción de sus plantillas. Incluso cuando las interacciones plantilla-metal parecen débiles, son más adecuadas que las interacciones intermoleculares que ocurren en los polímeros de impronta no covalente.

Si se comparan los polímeros no covalentes para cada análogo, se observa que en medios de reacción desfavorecidos, es decir con disolventes que compiten por la plantilla (MIP EGDMA CH4 en cloroformo y MIP EGDMA CC89 en metanol) el polímero de CC89 tiene una constante de adsorción cuatro veces mayor mientras

que el polímero de CH₄ tiene alrededor de tres veces más sitios de reconocimiento.

Si se comparan los polímeros no covalentes en medios de reacción que favorecen la adsorción de las plantillas (MIP EGDMA CH₄ en metanol y MIP EGDMA CC89 en cloroformo) se observa que tienen aproximadamente las mismas constantes de adsorción y número de sitios específicos.

Al comparar los polímeros de impronta molecular covalentes, se observa que el polímero CH₄ tiene una mayor constante de adsorción, alrededor de 1.7 veces mayor, pero el polímero CC89 tiene alrededor de 1.8 veces más sitios de reconocimiento.

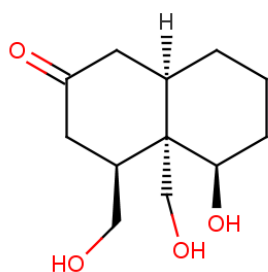
Se puede concluir que los polímeros de impronta con la horma CC89 y los polímeros de impronta con la horma CH₄ son muy similares con respecto a la afinidad, aunque el polímero de CC89 es ligeramente mejor, debido a que tanto las interacciones intermoleculares en los polímeros no covalentes como la interacción del análogo con Zn²⁺ son más adecuadas y esto se refleja en una mayor cantidad de sitios de reconocimiento específico y/o en constantes de adsorción mayores.

4. Prueba de especificidad

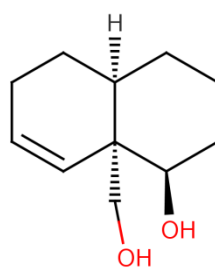
Para poder determinar que tan específico es el polímero MIP CC89 EGDMA, se realizó un experimento en un punto en el cual se evaluó la adsorción con respecto a diferentes analitos. Los resultados, en cloroformo, se presentan a continuación:

Tabla 31. Resultados cromatográficos de la adsorción de diferentes análogos en el polímero MIP CC89 EGDMA

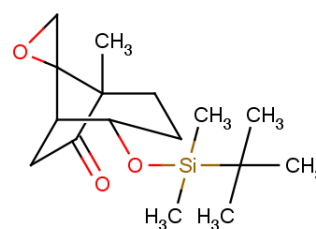
Polímero	MIP CC89 EGDMA	MIP CC89 EGDMA	MIP CC89 EGDMA
Análogo	CH4	CH2	CC89
t. retención	7.7	6.6	6.6
Ci (mol/L)	2.00E-03	2.00E-03	2.00E-03
Área del pico (pA)	13459.1	1551.7	885.7
Área del pico tras MIP/NIP (0.05g 5h) (pA)	11262.8	1245.3	575.9
Cf (mol/L)	1.67E-03	1.61E-03	1.30E-03
Cads (mol/L)	3.26E-04	3.95E-04	7.00E-04
%ads	16%	20%	35%



CC89



CH2



CH4

Figura 39. Estructura de análogos CC89, CH2 y CH4

De la prueba realizada se puede observar que la adsorción de los análogos CH4 y CH2 con el polímero MIP CC89 EGDMA es menor que la adsorción del análogo CC89 con el cual se realizó la impronta de este polímero. Los análogos CC89 y

CH4 son parecidos en tamaño pero muy diferentes en cuanto a sus grupos funcionales y su polaridad, mientras que los análogos CC89 y CH2 son muy parecidos en cuanto a polaridad y tamaño, pero difieren en algunos grupos funcionales (el grupo etilo y la cetona).

Esta prueba permite concluir que el polímero MIP CC89 EGDMA es específico al análogo CC89 tanto en polaridad como en detección de grupos funcionales y en geometría.

D. Evaluación in vitro de la adsorción de vomitoxina (DON) por el polímero de impronta molecular MIP CH4 PETA

Entre diciembre de 2012 y enero de 2013, se mandó una muestra del polímero MIP CH4 PETA a Estados Unidos de América para realizar una prueba in vitro de la adsorción de la molécula real, la vomitoxina, con un polímero de impronta molecular sintetizado con base en un análogo de tricoteceno, el análogo CH4. Por motivos de disponibilidad, tiempo y presupuesto se decidió enviar sólo un polímero y el más abundante en las reservas en aquel momento era el polímero MIP CH4 PETA, y por eso se realizó la prueba con este polímero. Ahora que se conocen las isotermas de enlace hubiera valido la pena realizar esta misma prueba con el polímero no covalente MIP CC89 EGDMA o con el polímero covalente MIP CC89 Zn EGDMA.

El ensayo de adsorción se realizó en el Trilogy Analytical Laboratory, Washington, Estados Unidos de América. Se utilizó una disolución estándar de vomitoxina en agua de concentración conocida. Se realizó un tratamiento de la disolución para fijar el pH. Se agitó durante 3h en presencia del polímero MIP CH4 PETA a temperatura constante, 37°C. A continuación, se centrifugó y se separaron las fases para cuantificar, por cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC DAD), la concentración remanente de DON en la disolución y obtener por resta la concentración adsorbida por el polímero.

Experimentalmente, la inclusión del polímero en el proceso de adsorción fue fijada en 2.5 kg/t. El nivel de vomitoxina fue fijado a 3ppm en los 10.5mL de la disolución de contacto.

Polímero	Adsorción de DON (%)	Folio No.
MIP CH4 PETA	21	114495

Tabla 32. Resultado de adsorción de DON por el equivalente a 2.5 Kg/t del polímero MIP CH4 PETA.

El resultado de 21% es en realidad un valor bajo, sin embargo se observa que con este polímero ya se tiene una interacción con la vomitoxina en un medio acuoso. Es importante mencionar que la vomitoxina es altamente soluble en agua, por ende existe competencia entre el disolvente y el polímero por la micotoxina lo cual dificulta el proceso de adsorción y disminuye la eficiencia. Además, el análogo CH4 posee grupos poco polares, por lo que el proceso de impronta no es muy eficiente, es decir la interacción horma-polímero es débil y entonces la competencia con el disolvente resulta en una afinidad mala.

E. Ligante Nvb-dpa

Se siguió el esquema de reacción siguiente:

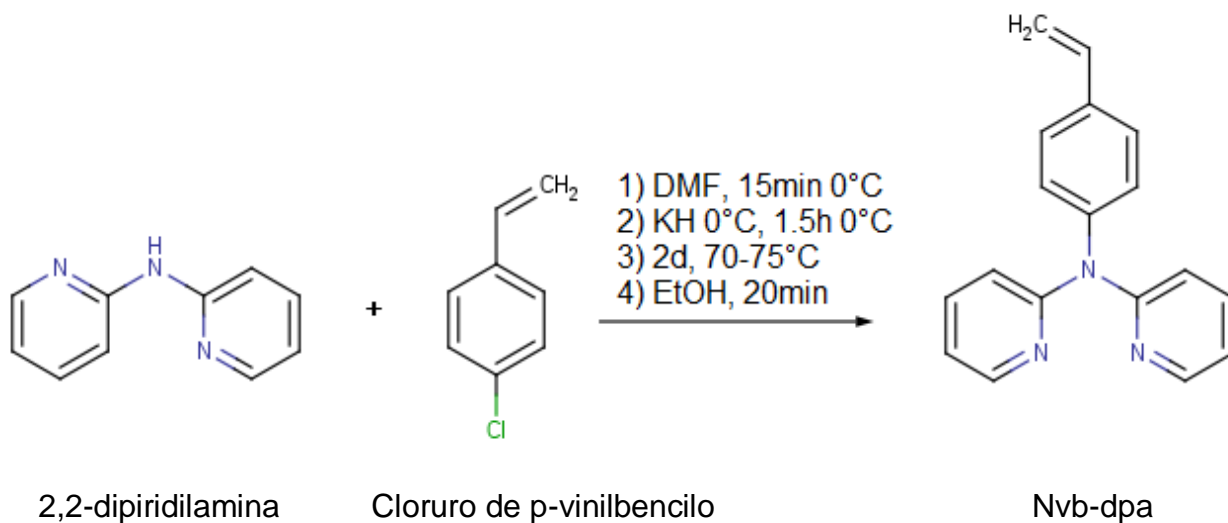


Figura 40. Esquema de la reacción de formación del ligante Nvb-dpa

Y se obtuvo un sólido blanco amarilloso con un rendimiento de 45% tras la purificación. El sólido se guardó y posteriormente se caracterizó mediante ^1H RMN y ^{13}C RMN.

A continuación se presentan los espectros de RMN de protón y de carbono 13.

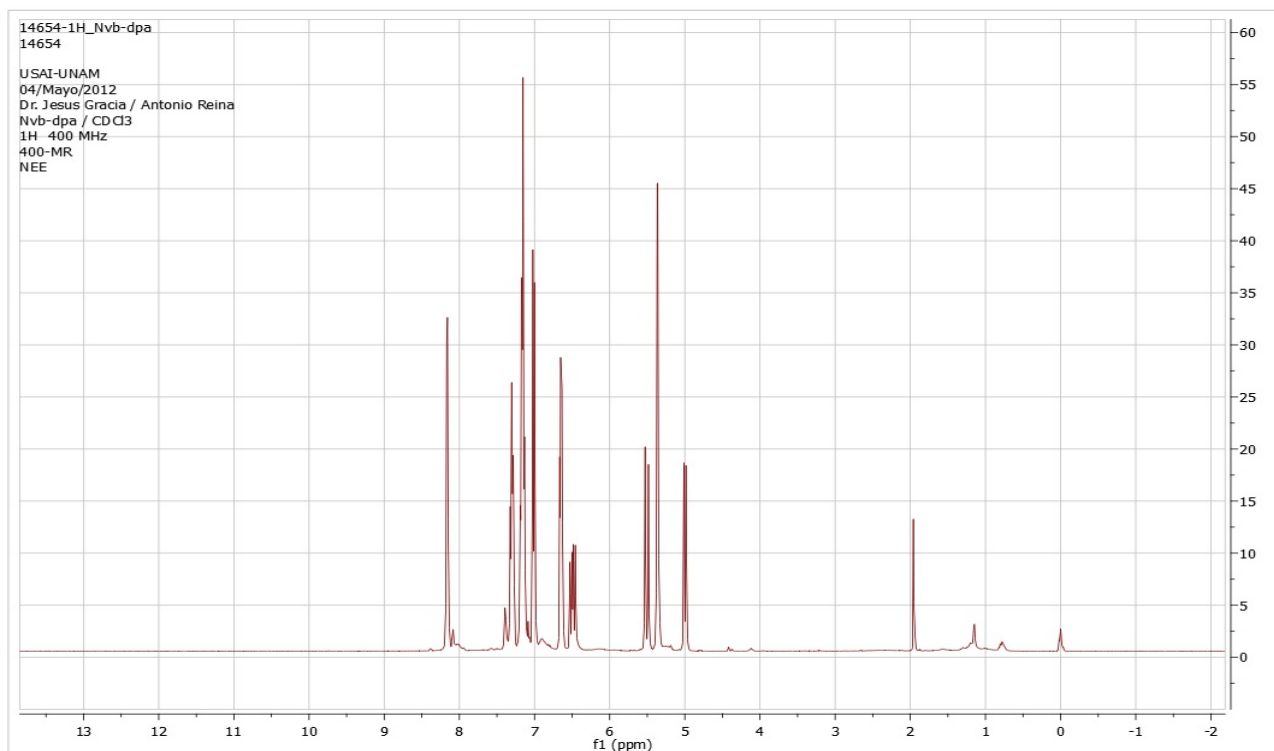


Figura 41. Espectro de RMN H^1 del Nvb-dpa

Tabla 33. Desplazamiento en el espectro de RMN de protón 1H .

Compuesto	Desplazamiento	Integración
Cl-pvb	4.5	2
Hdpa	5.2	1
Nvb-dpa	5.5	2

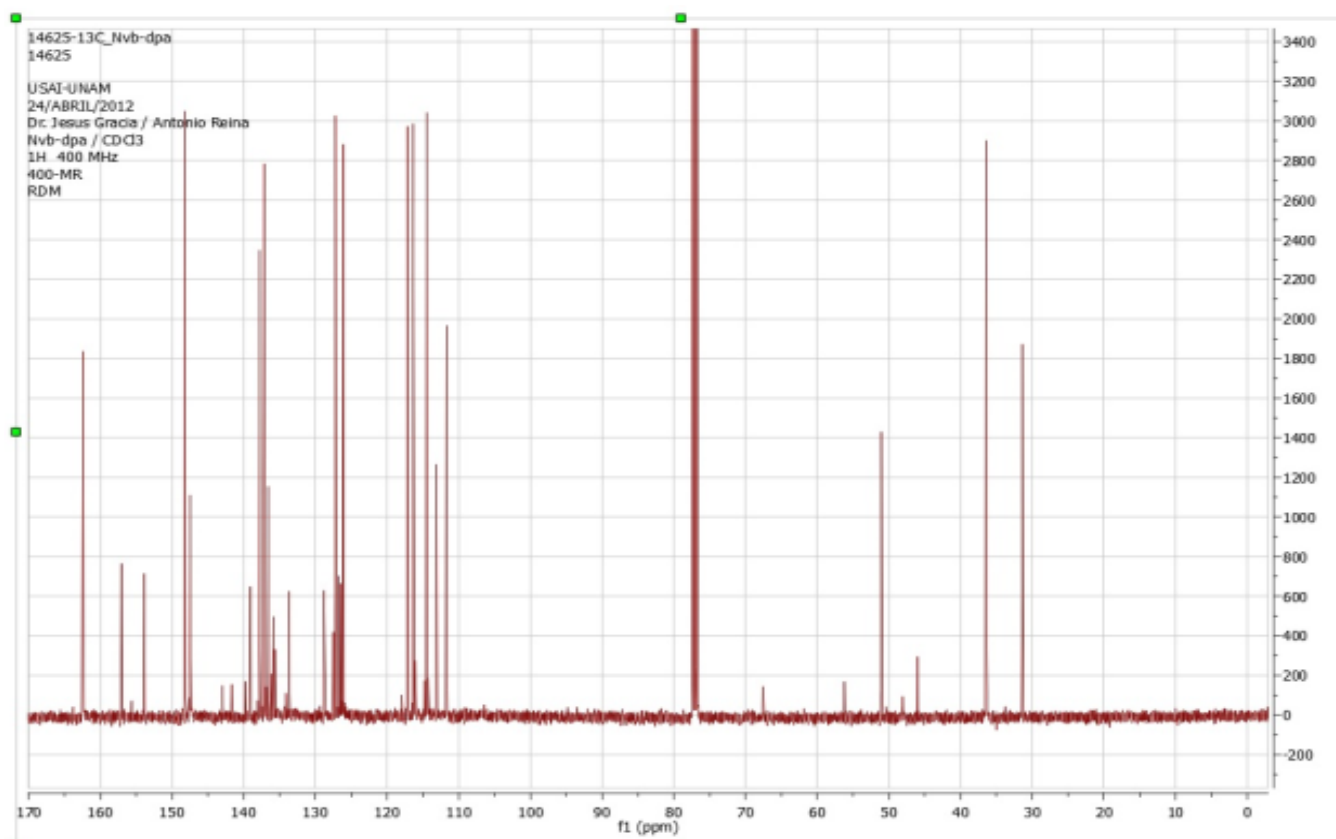


Figura 42. Espectro de RMN C^{13} del Nvb-dpa

La banda de 51ppm en el espectro de ^{13}C RMN indica la presencia del compuesto Nvb-dpa. Es la señal característica del metileno que se encuentra entre la amina terciaria y el anillo vinil bencílico. En el espectro podemos observar que hay impurezas en la muestra.

La 2,2-dipiridilamina tiene un pK_a de 13.68⁷⁹ para desprotonar la amina, con lo cual es necesario utilizar una base suficientemente fuerte y de allí la elección del hidruro de sodio. El disolvente de la mezcla es DMF seco por dos razones. Al ser un disolvente aprótico se promueve la reacción de sustitución nucleofílica SN_2 entre la amina desprotonada y el carbono unido al cloruro; además, al trabajar con hidruro de sodio no puede haber humedad en la mezcla, ya que reacciona rápida y violentamente con el agua. La reacción debe ocurrir en atmósfera inerte para evitar que el agua de la humedad ambiental reaccione con el hidruro. Por esto mismo la reacción se lleva a cabo a $0^\circ C$ de tal forma que se controle la

temperatura durante la reacción exérgica ácido-base entre la amina y el hidruro. El aumento de la temperatura, una vez empezada la reacción, a 75°C, por debajo del punto de ebullición del DMF, es para acelerar la reacción. Finalmente se le agrega etanol a la mezcla de reacción para eliminar todo el hidruro de sodio que pudo haber quedado sin reaccionar.

El mecanismo propuesto para esta síntesis se muestra en la figura 42.

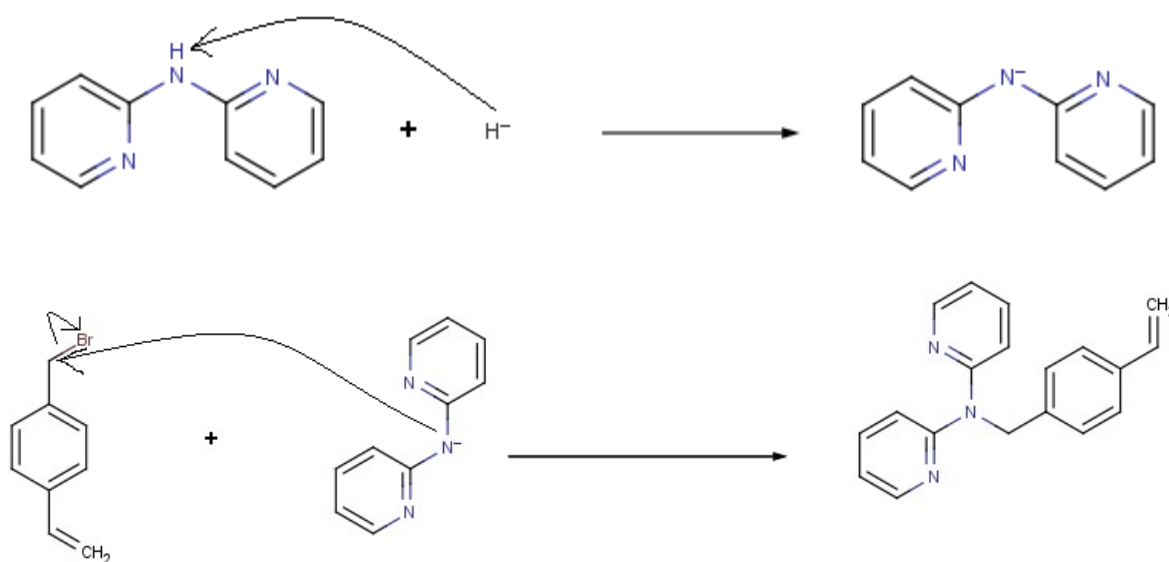


Figura 42. Mecanismo propuesto para la síntesis de Nvb-dpa

La reacción ocurre en dos etapas, primero se desprotona la amina y después ésta ataca nucleofílicamente al carbono del enlace C-Cl y se libera cloruro, que es un buen grupo saliente, para dar el ligante Nvb-dpa.

Este ligante tiene un grupo vinilo importante para la polimerización y es un ligante bidentado donador de nitrógeno que puede formar complejos estables con metales de transición, en particular el zinc podría derivar en un polímero complejo de impronta molecular eficiente y específico.

Ensayo de las interacciones entre zinc y el análogo CH4

En el ensayo realizado en el laboratorio, se llevaron a cabo múltiples reacciones entre un ligante bidentado, la horma de CH4 y sales de Zn^{2+} en la cuales los aniones eran donadores pobres, como el triflato, para evitar la competencia en la formación de compuestos de coordinación con la plantilla. Se varió también el medio de reacción, utilizando disolventes con distintos grados de polaridad y se hizo un seguimiento por espectroscopía IR. Los resultados indicaron que el ligante bidentado no es conveniente para formar polímeros de impronta molecular con centro metálico y el análogo CH4. A pesar de la baja basicidad de Lewis de la horma, existen interacciones con el ión metálico, sin embargo es necesario utilizar ligantes que no tengan constantes de formación tan altas con el metal, de lo contrario no se obtendrían complejos de ligantes mixtos y sólo se conseguirían sin el análogo de micotoxina.

Por otra parte, y aunque las pruebas no se hayan realizado todavía, si utilizáramos el análogo CC89, que es una base de Lewis más fuerte, esperaríamos que la interacción con el ión metálico y el ligante bidentado fuera mucho mejor y por ende decidimos sintetizar un ligante bidentado con propiedades para la polimerización.

F. Referencias

(70) García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E. *Sensors and Actuators B: Chemical* (2007), vol.123, p.1180.

(71) Yan, M.; Ramström, O. *Molecularly imprinted materials science and technology*; 1st ed.; Marcel Drekker: New York, USA, (2005).

(77) Cervera Flores, E. *Manual de Espectros de Infrarrojo*; Facultad de Química, UNAM: México, (2011).

(78) Sellergren, B., Ed.; *Molecularly Imprinted Polymers*; Elsevier Science: Amsterdam, (2001), vol.23.

(79) ACD labs inc. Chemical simulation software; Advanced Chemistry Development Inc.: Toronto, Canada, (2002).

VIII. Conclusión

Se sintetizaron cuatro polímeros de impronta molecular no covalentes que mostraron ser capaces de adsorber tanto al análogo de desoxinivalenol que se utilizó como horma de dichos polímeros como a la propia molécula de desoxinivalenol. Los MIP mostraron mayor afinidad que los polímeros sin impronta molecular, lo que demuestra que la impronta molecular permite la formación de sitios de reconocimiento con geometría y polaridad diseñada en pro del reconocimiento específico. Los polímeros MIP CC89 EGDMA en cloroformo y MIP CH4 EGDMA en metanol mostraron altas constantes de adsorción además de tener más sitios activos de reconocimiento por unidad de área que el resto de los polímeros. Además se demostró la especificidad del polímero MIP CC89 EGDMA en presencia de moléculas de polaridad y geometría semejantes a la plantilla CC89.

Se sintetizaron también dos polímeros de impronta molecular covalentes, formalmente de coordinación, que resultaron tener mayor afinidad para la adsorción de los análogos de tricotecenos que los polímeros no covalentes. El polímero MIP CC89 Zn EGDMA mostró el mayor porcentaje de adsorción, 72.53%.

Se realizó la prueba de adsorción de la vomitoxina o desoxinivalenol in vitro con el polímero MIP CH4 PETA y se obtuvo que el polímero es capaz de retirar hasta 21% de la micotoxina en agua. Con base en los experimentos que se realizaron, se puede inferir un mejor rendimiento de adsorción utilizando los polímeros MIP CC89 EGDMA o MIP CC89 Zn EGDMA en cloroformo, o MIP CH4 EGDMA o MIP CH4 Zn EGDMA en metanol.

Finalmente se sintetizó el ligante Nvb-dpa, que puede formar compuestos de coordinación bidentados con zinc y derivar en la formación de un polímero de impronta molecular más eficiente y específico, sin embargo no forma complejos de ligantes mixtos $[Zn(\text{análogo de micotoxina})(Nvb-dpa)]^{2+}$.