



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

78/001  
10/Depto

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN POLÍMERO IMPRESO MOLECULARMENTE  
COMO ADSORBENTE SELECTIVO PARA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE  
FLURBIPROFENO.

INFORME DE INVESTIGACIÓN  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

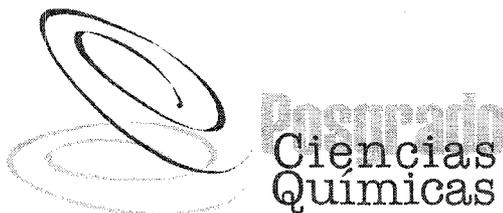
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

HARLEM HAYDEÉ CRUZ BAILÓN



QUÍMICA  
D.F.P.G.



TUTOR: LUZ ELENA VERA ÁVILA

AÑO: 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# Índice

I. Introducción

II. Objetivo

III. Desarrollo Experimental

IV. Resultados

V. Conclusiones

VI. Bibliografía

# PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN POLÍMERO IMPRESO MOLECULARMENTE COMO ADSORBENTE SELECTIVO PARA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE FLURBIPROFENO.

## I. Introducción

El interés de separar y cuantificar analitos presentes en mezclas complejas, ha conducido al desarrollo de fases estacionarias cada vez más selectivas, en cromatografía líquida. El uso de anticuerpos inmovilizados en una fase sólida ha sido exitoso, con ello se logra la concentración de las muestras y la liberación del analito de interés de toda o casi toda la matriz, debido a la alta afinidad que existe entre el anticuerpo y la molécula para la cual fue sintetizado. Los polímeros impresos molecularmente (PIM) son materiales capaces de unir a moléculas determinadas con una afinidad y especificidad semejante a la de los anticuerpos. En la síntesis del polímero, los monómeros funcionales y el entrecruzador se polimerizan en presencia de un analito blanco, llamada molécula de impresión o plantilla; al polimerizarse, los grupos funcionales de la molécula quedan inmovilizados espacialmente en la estructura polimérica altamente entrecruzada. Cuando se remueve la plantilla, ésta deja sitios de unión complementarios en forma y tamaño a ella. De esta manera se introduce una memoria molecular en el polímero y éste es capaz de unir selectivamente al analito blanco o a sustancias altamente relacionadas. Estos materiales han resultado ser útiles en separaciones de afinidad, catálisis y biosensores, lo que aunado a su estabilidad y bajo costo los hacen particularmente atractivos para aplicaciones industriales.

### Mecanismo de impresión.

El proceso de la impresión molecular está compuesto de los siguientes pasos (Figura 1):

1. Formación de un complejo plantilla-monomero funcional mediante enlaces covalentes o no-covalentes.
2. Polimerización de este complejo en presencia de un entrecruzador, la estructura del complejo se congela en una red polimérica tridimensional.
3. Remoción de la plantilla del polímero para liberar las cavidades sintetizadas. Bajo condiciones adecuadas, las cavidades liberadas por la plantilla, unen a la molécula o análogo de manera eficiente y selectiva.

### Impresión covalente.

Antes de la polimerización el monómero funcional y la plantilla se unen covalentemente, durante la polimerización la unión no se altera y en la remoción de la plantilla la unión se rompe. En el reconocimiento posterior de la cavidad por la molécula de impresión, la unión covalente se vuelve a generar.

### Impresión no-covalente.

El monómero funcional y la plantilla interaccionan no-covalentemente (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, enlaces de coordinación, etc.), estos complejos, también llamados de prepolimerización, se obtienen por la simple adición de los compuestos a la mezcla de reacción. Después de la polimerización, la plantilla se remueve del polímero por medio de una extracción con solventes. En el reconocimiento posterior de la cavidad por la molécula de impresión tienen lugar las interacciones no-covalentes que la formaron.

## Impresión covalente

Ventajas	Desventajas
<p>El complejo de prepolimerización es estable y está bien caracterizado.</p> <p>Se utilizan una gran variedad de condiciones de polimerización: altas temperaturas, pH altos o bajos, uso de solventes polares, etc.</p>	<p>La síntesis del complejo de prepolimerización es difícil y poco económica.</p> <p>El número de uniones covalentes reversibles disponibles es limitado.</p> <p>El efecto de impresión disminuye en el paso de extracción de la plantilla, ya que ésta requiere condiciones extremas.</p> <p>La unión y liberación de la plantilla es lenta, ya que involucra la formación y ruptura de un enlace covalente.</p>

Tabla 1. Resumen de las características de la impresión covalente.

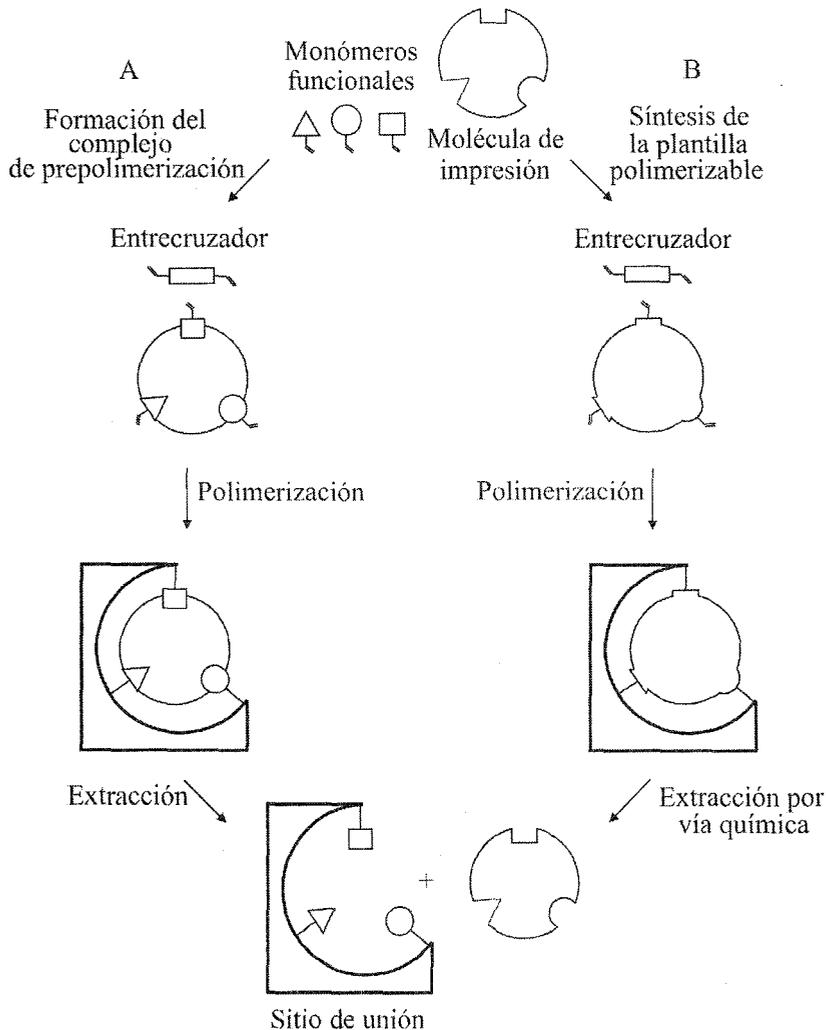


Figura 1. Representación del principio de impresión molecular. A. Vía interacciones no-covalentes. B. Vía enlaces covalentes.

## Impresión no-covalente

Ventajas	Desventajas
No es necesario sintetizar un complejo de prepolimerización.	El proceso de impresión es menos exacto, ya que el complejo de prepolimerización es lábil y no es estequiométrico.
La remoción de la plantilla se facilita con el uso de condiciones suaves de extracción, ya que se encuentran unidos mediante interacciones no-covalentes débiles.	Las condiciones de polimerización deben ser elegidas cuidadosamente, para maximizar la formación del complejo de prepolimerización.
La unión y liberación de la plantilla es rápida.	El monómero funcional se coloca en exceso para garantizar la formación del complejo de prepolimerización, como resultado se producen sitios de unión no específicos, disminuyendo la selectividad de la unión.

Tabla 2. Resumen de las características de la impresión no-covalente.

### Materiales de polimerización.

Para llevar a cabo la impresión molecular es necesaria la presencia de un analito blanco, monómeros funcionales (impresión covalente y no-covalente), agentes entrecruzadores, solventes para la polimerización, solventes para extraer la plantilla o agentes que promuevan la ruptura de la plantilla con la cavidad, así como iniciadores de la polimerización.

### Monómeros funcionales.

Un requisito de la polimerización, es que ésta se lleve a cabo de tal manera que el conjugado plantilla-monómero funcional y entrecruzador permanezcan intactos. Hasta el momento, la mayoría de los polímeros impresos reportados se han sintetizado vía polimerización radical de monómeros funcionales y entrecruzadores que poseen grupos vinílicos o acrílicos. Esto se atribuye a la síntesis directa de este tipo de monómeros y a la basta opción de monómeros disponibles. Estos pueden ser básicos (vinilpiridina) o ácidos (ácido metacrílico), permanentemente cargados (N,N,N-trimetilaminoetilmetacrilato), con capacidad para formar puentes de hidrógeno (acrilamida), hidrofóbicos (estireno), entre otros. Estos monómeros generalmente tienen constantes de asociación con la plantilla demasiado bajas como para formar complejos estables. De manera que hay que usarlos en exceso para desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo.

### Agentes entrecruzadores.

El papel fundamental de estos reactivos es fijar la cavidad formada dentro de la estructura polimérica, además de hacer insolubles a los polímeros frente a una gran variedad de solventes, facilitando su aplicación práctica. En este caso, se usan frecuentemente el dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) y el divinilbeneno.

La relación molar del agente entrecruzador y el monómero funcional es importante, ya que si la relación molar es pequeña, las cavidades se encuentran cerca una de otra y no pueden trabajar de manera independiente. Con relaciones molares altas, generalmente se daña la impresión molecular, especialmente cuando el entrecruzador presenta interacciones con la plantilla y el monómero funcional. Las relaciones típicas plantilla:monómero funcional:entrecruzador en la impresión no covalente son 1:6:30 y 1:8:40.

### Solventes.

El papel del solvente es producir una estructura porosa en el polímero impreso, de tal manera que la molécula de impresión pueda entrar y salir de la cavidad con facilidad. Durante la polimerización se incorporan moléculas de solvente dentro de la red polimérica, mediante un tratamiento posterior del polímero se remueven las moléculas de solvente y éste deja poros. Otro papel del solventes es dispersar el calor de la reacción, ya que pueden ocurrir reacciones secundarias indeseables, como la supresión del complejo monómero funcional-plantilla necesario en la impresión no covalente.

En la impresión covalente es posible emplear una gran gama de solventes, con la condición que disuelvan la mezcla de reacción, en cambio, en la impresión no covalente la elección del solvente es crítica, ya que se debe promover la formación del complejo de prepolimerización en orden de incrementar la eficiencia de la impresión. El cloroformo es uno de los solventes preferidos, éste disuelve a un gran número de plantillas y monómeros funcionales y difícilmente suprime las interacciones por puentes de hidrógeno.

### Procedimientos de polimerización.

La polimerización se puede iniciar por la descomposición térmica de iniciadores radicales. Típicamente se usan el 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (AIBN) y el 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) (ADVN). Los radicales formados por la descomposición atacan al monómero, produciendo la propagación de los radicales. La reacción es muy sencilla y económica. Es necesario remover el O<sub>2</sub> de la mezcla de reacción, ya que éste puede retardar o parar la reacción.

En el caso de las impresiones no covalentes, los complejos de prepolimerización son inestables a altas temperaturas, y la polimerización debe ser llevada a cabo a bajas temperaturas. La descomposición del iniciador no puede llevarse a cabo con un incremento de la temperatura, sino vía radiación UV. El AIBN se descompone a una longitud de onda de 365 nm y a 60 °C.

### Impresión covalente.

Una de las claves para el éxito de la impresión covalente es la elección del enlace covalente entre el monómero funcional y la plantilla. La unión debe ser lo suficientemente estable para mantenerse durante la polimerización y lo suficientemente lábil como para permitir la disociación del complejo bajo condiciones de extracción suaves, de tal manera que no se dañe el efecto de impresión. El número de enlaces covalentes que cumplen con este requisito es bajo, entre ellos se encuentran los ésteres del ácido fenilborónico, acetales, cetales, bases de Schiff, enlaces disulfuro y enlaces de coordinación.

Este sistema fue desarrollado por Wulff y colaboradores. La impresión del monómero 1a es un ejemplo de impresión covalente. La plantilla es el fenil- $\alpha$ -D-manopiranosido (1b) al cual se unen por esterificación dos moléculas de ácido 4-vinilfenilborónico. El ácido borónico sufre una reacción rápida y reversible con los dioles. El monómero 1a es sujeto a copolimerización vía radical en presencia de grandes cantidades de entrecruzador y de un solvente inerte. Esto produce un polímero con una alta superficie interna y una estructura porosa permanente. Cerca del 95% de la plantilla se extrae del polímero con agua o metanol (Figura 2).

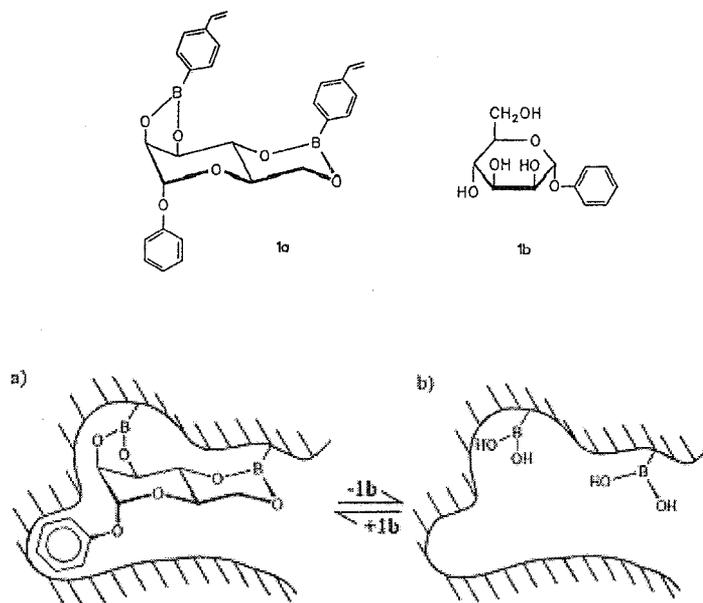


Figura 2. Representación de la cavidad a) obtenida de la polimerización de 1a. La plantilla 1b se remueve con agua o metanol para dar b). La adición de 1b provoca la ocupación de la cavidad a). En este caso la unión de la plantilla tiene lugar por un enlace covalente.

#### Impresión no covalente.

El complejo entre el monómero funcional y la plantilla se forma vía enlaces no covalentes, mediante interacciones de puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, etc. La impresión no-covalente de la cual es pionero Mosbach y colaboradores, es más flexible en cuanto a la elección de monómeros funcionales, moléculas blanco y en general a los materiales de impresión. Después de la polimerización la molécula de impresión se remueve por una simple extracción con solventes. Sin embargo, el complejo de prepolimerización es un sistema en equilibrio y su estabilidad depende de la constante de afinidad entre la molécula de impresión y del monómero funcional. Figura 3.

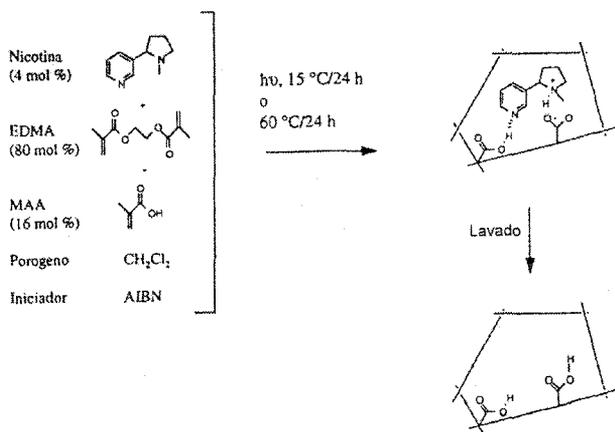


Figura 3. Impresión molecular usando ácido metacrílico como monómero funcional y nicotina como plantilla.

## II. Objetivo

- Establecer la metodología para sintetizar un PIM contra flurbiprofeno.
- Realizar el estudio del comportamiento de este material en sistemas de EFS y establecer las condiciones apropiadas para diferenciar el polímero blanco del impreso.

### III.1 Desarrollo Experimental

#### Materiales y equipo.

Flurbiprofeno (99.9% de pureza)

4-Vinilpiridina (4-VP) de Sigma

Dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) de Aldrich

Azo-bis-isobutironitrilo (AIBN) de Dupont

Acetonitrilo (ACN) de J.T. Baker, grado HPLC

1,2-Dicloroetano de Burdick and Jackson, grado HPLC

Diclorometano (DCM) de Burdick and Jackson, grado HPLC

Metanol (MeOH) de Omnisolv, grado HPLC

Tetrahidrofurano (THF) de Fisher Scientific, grado HPLC

Ácido acético (AcOH, 99.7%) de J.T. Baker

Ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>, 69-72%) de J.T. Baker

Nitrógeno comprimido Praxair, grado 4.8

Purificador y desionizador de agua NANO pure (Barnstead Thermolyne modelo 04747).

Baño de ultrasonido para desgasificar soluciones (Sonicor modelo SC-100). Plancha de calentamiento Thermolyne, modelo Cimarec 2. Termómetro de -10 a 400°C.

Cromatógrafo de líquidos Gilson con dos bombas (Modelos 305 y 306), mezclador (Modelo 811 B) y módulo manométrico (Modelo 805). Inyector Rheodyne 7125 con loop de 20 µL. Detector espectrofotométrico UV-Vis Shimadzu SPD-10 AVVP. Integrador Hewlett Packard (HP3396A). Columna (150 x 4.6 mm) empacada con fase reversa Hypersil ODS de 5 µm; fase móvil: ACN-HClO<sub>4</sub> 0.01M 44:56 (v/v); flujo: 1 mL/min; λ de detección: 254 nm, sensibilidad 0.002 AUFS.

Las cuantificaciones se realizaron contra un estándar de 0.2 ppm de flurbiprofeno disuelto en fase de elución.

### III.2 Preparación del polímero.

61 mg (0.25 mmol) de flurbiprofeno y 210 mg (2 mmol) de 4-VP se colocaron dentro de un tubo Pyrex con tapa rosca, se agregaron 1.98 g (10 mmol) de EDMA y se solubilizaron en 2.8 mL de cloroformo con ayuda de un sonicador y manteniéndolas en baño de hielo. Se adicionaron 18 mg (0.11 mmol) de AIBN. La mezcla final se mantuvo en hielo y se purgó con una corriente suave de nitrógeno durante 10 minutos. Un polímero blanco se preparó de la misma manera, pero la polimerización se llevó a cabo en ausencia de plantilla. Los tubos se colocaron en baño maría a 50°C durante 24 horas. Los polímeros se molieron en un mortero y se realizó la extracción de la plantilla mediante lavados sucesivos del polímero con: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL), ACN (20 mL), MeOH-AcOH 80:20 (4 x 20 mL) y MeOH (8 x 20 mL). El polímero se secó a 50°C y se empacaron 300 mg del polímero blanco y del impreso en jeringas de polipropileno, utilizando filtros de acero inoxidable para asegurar el empaque.

El procedimiento de síntesis de los polímeros se ilustra en la figura 4.

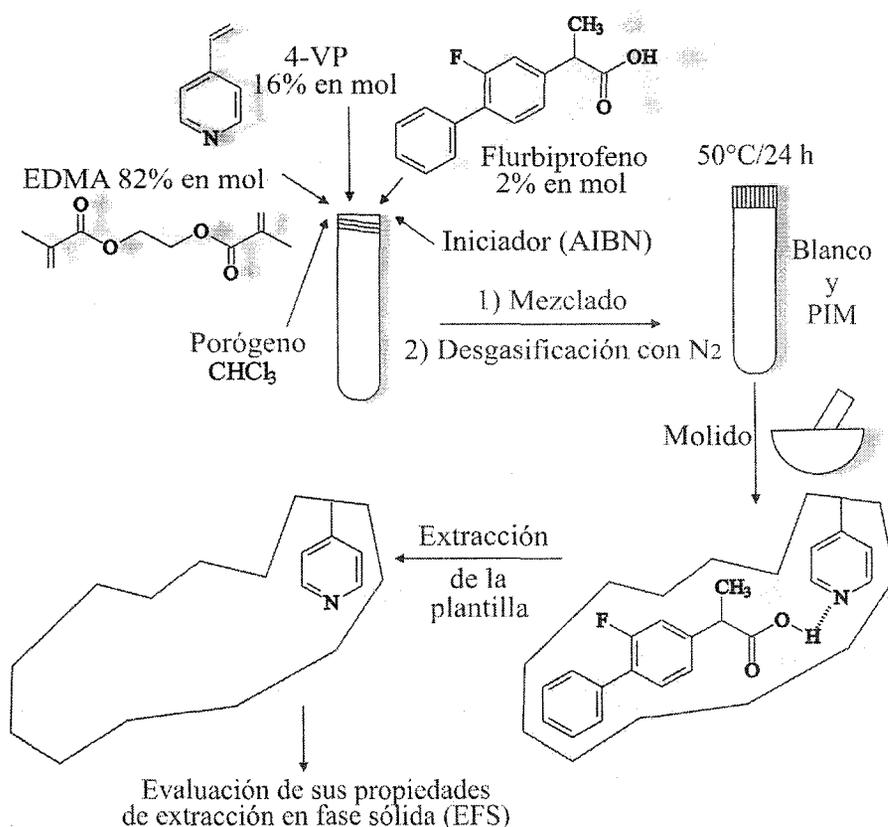


Figura 4. Impresión molecular no covalente. En ésta ocurren interacciones entre la plantilla y la 4-vinilpiridina vía puentes de hidrógeno. Después de la polimerización, en presencia del entrecruzador (EDMA), se obtienen sitios de unión complementarios en forma, tamaño y funcionalidad a la plantilla.

### III.3 Procedimiento de extracción en fase sólida.

El procedimiento, esquematizado en la figura 5, consta de 4 pasos:

- 1) Acondicionamiento del adsorbente con 15 mL de 1,2-Dicloroetano.
- 2) Aplicación de la muestra disuelta en 1,2-Dicloroetano
- 3) Lavado del adsorbente con 1 mL de Diclorometano.
- 4) Elución del analito con 2 mL de MeOH-NH<sub>4</sub>OH 0.01M (9:1) a un flujo de 1 mL/min.

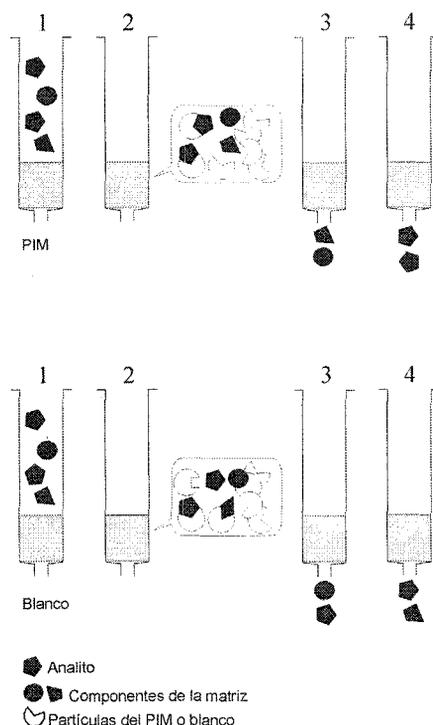


Figura 5. 1) Cuando el adsorbente se acondiciona está listo para la carga del analito. 2) Adsorción selectiva del analito por el polímero impreso y adsorción no selectiva del analito y los componentes de la matriz en el blanco. 3) Lavado selectivo que permite eluir los componentes de la matriz en el caso del PIM y en el blanco se eluyen tanto la matriz como el analito de interés. 4) Elución del analito con un solvente fuerte en el PIM y elución, en su caso, de compuestos residuales en el blanco (tanto analito como matriz).

#### IV. Resultados.

##### IV.1 Preparación de los polímeros.

Se prepararon diferentes polímeros variando el solvente porogénico. Los solventes ensayados fueron: hexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano cloroformo, y tetrahidrofurano. En la tabla 3 se resumen las condiciones utilizadas en la preparación de estos materiales. Para cada PIM sintetizado se preparó paralelamente un blanco bajo las mismas condiciones, pero sin adición de la plantilla.

Tabla 3. Condiciones para la preparación de los PIM.

Relación	Plantilla	Monómero Funcional	Entrecruzador	Disolvente	AIBN
1:8:40	61 mg (0.25 mmol)	210.0 mg (2 mmol)	1.98 g (10 mmol)	2.8 mL de Hexano	18 mg (0.11 mmol)
1:8:40	61 mg (0.25 mmol)	210.0 mg (2 mmol)	1.98 g (10 mmol)	2.8 mL de ClCH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> Cl	18 mg (0.11 mmol)
1:8:40	61 mg (0.25 mmol)	210.0 mg (2 mmol)	1.98 g (10 mmol)	2.8 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	18 mg (0.11 mmol)

Relación	Plantilla	Monómero Funcional	Entrecruzador	Disolvente	AIBN
1:8:40	61 mg (0.25 mmol)	210.0 mg (2 mmol)	1.98 g (10 mmol)	2.8 mL de CHCl <sub>3</sub>	18 mg (0.11 mmol)
1:6:30	61 mg (0.25 mmol)	158.0 mg (1.5 mmol)	1.50 g (7.5 mmol)	2.2 mL de CHCl <sub>3</sub>	15 mg (0.09 mmol)
1:6:30	61 mg (0.25 mmol)	158.0 mg (1.5 mmol)	1.50 g (7.5 mmol)	2.2 mL de THF	15 mg (0.09 mmol)

El polímero preparado en hexano fue descartado porque resultó sumamente quebradizo y por lo tanto no apto para su empleo posterior en sistemas de extracción en fase sólida (EFS). Los demás polímeros presentaron buenas características de rigidez, por lo que se procedió a someterlos a lavados intensivos para remover los subproductos de reacción y extraer la plantilla. Ensayos preliminares demostraron que los lavados del material en lote eran poco efectivos (p. ej. Soxhlet), por lo que se optó por un sistema de elución, realizando los lavados de los polímeros una vez empacados en los cartuchos.

Se ensayaron una gran variedad de solventes puros y mezclas para tratar de extraer completamente la plantilla. Durante estos ensayos se observó que los solventes muy polares, como el agua y sus mezclas, provocaban la contracción de los polímeros, dado el carácter poco polar de éstos. En consecuencia, al cerrarse los poros por contracción de la red polimérica, la cantidad de plantilla extraída disminuía. Por otra parte, los solventes de baja polaridad, aunque permitían la expansión del polímero, tampoco resultaron adecuados debido a su bajo poder de solvatación del flurbiprofeno.

Finalmente, se estableció la secuencia de lavado siguiente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ACN, MeOH-AcOH y MeOH. El diclorometano provoca un alto grado de hinchamiento del polímero abriendo al máximo sus poros. El acetonitrilo mantiene al polímero suficientemente expandido y comienza a extraer la plantilla por sus propiedadesceptoras de protones; sin embargo, no es suficientemente fuerte para competir con los residuos piridina de la superficie del soporte. Por el contrario, la mezcla MeOH-AcOH posee la mayor capacidad de extracción de la plantilla como puede observarse en la figura 6. El mecanismo de extracción se basa en la protonación de los residuos piridina presentes en las cavidades formadas, debilitando la unión vía puente de hidrógeno entre el protón del grupo carboxilo del flurbiprofeno y el nitrógeno de la piridina; este efecto se magnifica por la competencia que ejercen el metanol y el ácido acético, para interactuar con la plantilla y con los residuos piridina, respectivamente. El problema de esta mezcla es que el polímero empieza a contraerse después de cierto volumen pasado por el cartucho y la remoción de la plantilla disminuye. El lavado final con metanol tiene por objeto restaurar en parte el hinchamiento del polímero y eliminar el ácido presente en los canales y poros de su estructura.

Los problemas de contracción del polímero en presencia de solventes polares (especialmente en presencia de mezclas con agua) fueron más notorios en el caso de los materiales preparados con dicloroetano o diclorometano como porógenos. Por ello, una porción importante de la plantilla no pudo removerse. Estos polímeros fueron entonces descartados para el trabajo subsecuente.



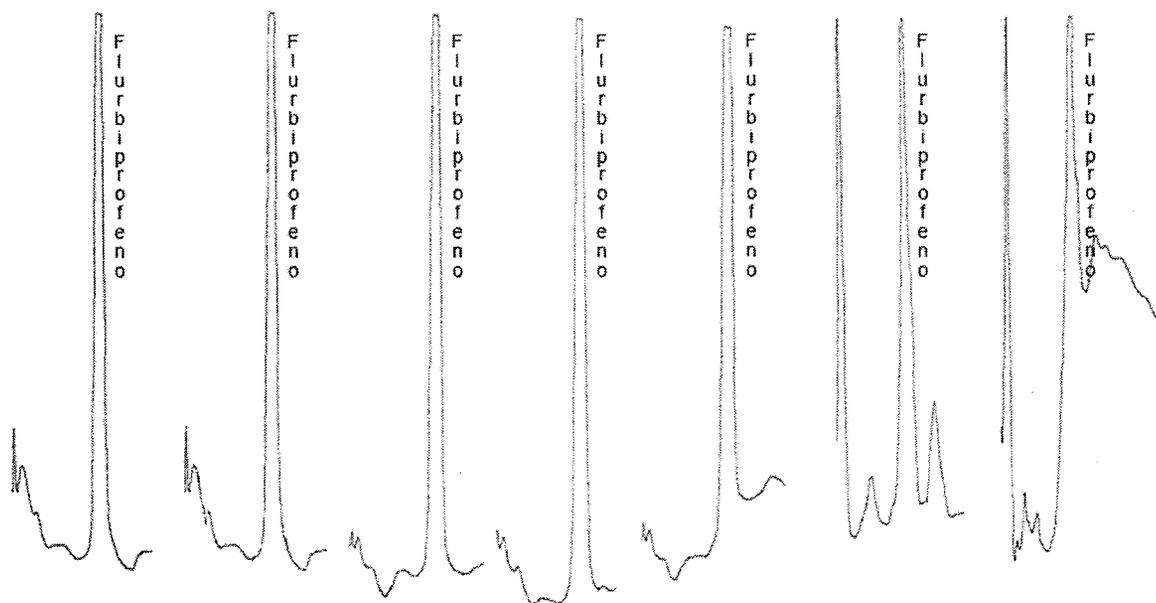


Fig 6. Inyecciones de porciones sucesivas del efluente del cartucho durante el lavado con la mezcla MeOH-AcOH 80:20. Polímero impreso con flurbiprofeno preparado en 1,2-dicloroetano.

#### IV.2 Ensayos de Extracción en Fase Sólida (EFS)

Dadas las dificultades que se tuvieron para la remoción de la plantilla en los polímeros sintetizados, era obvio que uno de los puntos más críticos en el proceso de EFS sería la selección del solvente de elución. Se requería un solvente capaz de eluir cuantitativamente el analito retenido, utilizando un volumen pequeño de eluyente, para no comprometer la sensibilidad en la determinación cromatográfica del compuesto de interés. Inicialmente se ensayaron como eluyentes soluciones de  $\text{HClO}_4$  0.01M, 0.05M y 0.1M en MeOH. En estos experimentos se trabajó con el polímero 1:8:40 (relación molar plantilla:monómero funcional:entrecruzador) preparado en cloroformo. En la tabla 4 se muestran los recobros obtenidos en 3 experimentos de EFS realizados en el cartucho con PIM y en el cartucho con polímero blanco, utilizando  $\text{HClO}_4$  0.1M en MeOH como eluyente. La carga se realizó en el solvente débil dicloroetano para favorecer la retención del flurbiprofeno. Como puede observarse el analito recuperado en los eluatos varió significativamente de un experimento a otro en ambos cartuchos. El origen de este problema pudo detectarse al efectuar una prueba de estabilidad del flurbiprofeno en MeOH con  $\text{HClO}_4$  0.1M. Ésta mostró que el analito se degradaba, por lo que se decidió no usar un medio ácido para la elución.

Polímero	Elución/Recobro en $\mu\text{g}$
Blanco	0.49
Impreso	0.47
Blanco	0.60
Impreso	0.64
Blanco	0.46
Impreso	0.43

Tabla 4. Flurbiprofeno ( $0.2 \mu\text{g/mL}$ ) en 1,2-dicloroetano, lavado con 5 mL de MeOH, elución con 5 mL de  $\text{HClO}_4$  0.1 M en MeOH. Cartucho con 100 mg de empaque.

Posteriormente se probó una mezcla de MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v) con NaOH 0.05M. Este eluyente tampoco dio buenos resultados, los recobros en unos experimentos eran muy bajos y en otros superaban el 100%. Esto indicaba que el flurbiprofeno no era eluido completamente en cada ciclo de EFS, por lo que se acumulaba en el cartucho y ocasionalmente una porción importante de lo acumulado era arrastrada en la elución siguiente.

Como ya se ha comentado, el agua tiende a contraer el polímero, por lo que los efectos observados podrían deberse en parte al cierre de los poros y no sólo a la falta de fuerza del eluyente. Por ello en las siguientes pruebas se redujo la porción de fase acuosa en el eluyente a 10% y se sustituyó el metanol por alcohol isopropílico (IPA), ya que en este último el polímero se hincha en mayor medida que con el primero. Además, la fase acuosa fue alcalinizada con sosa para provocar la ionización del grupo carboxilo del flurbiprofeno y así debilitar su interacción con los residuos piridina del adsorbente. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos utilizando como eluyente IPA-NaOH (0.1 M) 9:1 (v/v), en cartuchos empacados con tres diferentes PIMs y sus respectivos blancos. En algunos ensayos el eluyente se percoló después de calentarlo a  $50^\circ\text{C}$ . La carga y el lavado se realizaron en las mismas condiciones que en los experimentos anteriores.

Polímero	Porógeno	Cantidad de empaque	Recobro	
			Blanco ( $\mu\text{g}$ )	PIM ( $\mu\text{g}$ )
1:6:30	THF	100 mg	0.00 <sup>1</sup>	0.30 <sup>1</sup>
1:6:30	THF	100 mg	0.00 <sup>2</sup>	0.40 <sup>2</sup>
1:6:30	$\text{CHCl}_3$	100 mg	0.00 <sup>1</sup>	0.48 <sup>1</sup>
1:6:30	$\text{CHCl}_3$	100 mg	0.00 <sup>2</sup>	2.06 <sup>2</sup>
1:8:40	$\text{CHCl}_3$	100 mg	0.18 <sup>2</sup>	0.95 <sup>2</sup>

Tabla 5. Carga de  $1 \mu\text{g}$  de flurbiprofeno en 25 mL de dicloroetano, flujo de carga y elución: 1 mL/min, lavado: 5 mL de metanol, elución: 5 mL de IPA-NaOH 0.1 N (9:1). <sup>1</sup>Elución en frío. <sup>2</sup>Elución con solvente caliente.

De acuerdo con los resultados de la tabla 5, los polímeros preparados con la relación 1:6:30 en THF y  $\text{CHCl}_3$  muestran una clara diferencia en el comportamiento de retención del PIM y el blanco. En los eluatos de los cartuchos blanco no se detecta la presencia del analito, ya sea porque éste no fue retenido durante la carga o porque fue desalojado durante el lavado. Por el contrario, en los PIM se alcanza a recuperar una fracción del compuesto en los eluatos, pero ésta es inferior al 50%. Sin embargo, el resultado aberrante del cuarto ensayo (con un recobro del 206% en el PIM) parece indicar que la plantilla original no logró ser removida completamente durante los lavados intensivos del polímero y parte de ella eluyó en este ensayo al percolar el solvente caliente. El PIM

preparado en cloroformo con la relación molar 1:8:40 permitió obtener el mayor recobro del analito, aunque su respectivo blanco también retuvo una pequeña fracción del soluto. Por otra parte, aunque la elución con solvente caliente parece ser un poco más efectiva, las condiciones durante el experimento no son constantes pues el solvente se enfría rápidamente; por ello se prefirió usar el solvente a temperatura ambiente en el trabajo subsecuente. Así mismo, se decidió seguir trabajando con el polímero 1:8:40 preparado cloroformo para las siguientes pruebas.

Se empacaron nuevos cartuchos con el PIM y su blanco, aumentando la cantidad de adsorbente a 300 mg. Se optó por continuar utilizando la mezcla IPA-NaOH 0.1 N, 9:1 (v/v) como eluyente y se buscó optimizar la etapa de lavado en el proceso de EFS. El disolvente de lavado óptimo (en cuanto a composición y volumen) debe ser suficientemente fuerte para desalojar al compuesto de interés (y cualquier otro compuesto) no retenido específicamente en el soporte, pero no debe ser tan fuerte que destruya las interacciones específicas del flurbiprofeno con los residuos piridina de la cavidad impresa. En otras palabras, con un lavado óptimo se debería obtener un recobro nulo en el polímero blanco y un recobro lo más alto posible en el PIM durante la etapa de elución. Obviamente el recobro en el PIM depende también en gran medida de la efectividad alcanzada en la impresión de la plantilla durante la síntesis del polímero. En la tabla 6 se muestran las diferentes condiciones de lavado ensayadas y los resultados obtenidos.

Lavado	Recobro		Relación PIM/Blanco
	Blanco ( $\mu\text{g}$ )	PIM ( $\mu\text{g}$ )	
5 mL MeOH	0.44	0.71	1.6
5 mL MeOH	0.43	1.14	2.6
3 mL MeOH	0.47	1.31	2.8
5 mL de MeOH	0.00	0.15	-
5 mL de ACN	0.26	0.73	2.9
5 mL de MeOH/DCM 1:1	0.02	0.17	7.4
5 mL IPA	0.23	0.18	0.8
10 mL de DCM	0.14	0.34	2.4
5 mL de DCM	0.25	0.64	2.5

Tabla 6. PIM preparado en  $\text{CHCl}_3$  con proporciones 1:8:40 (plantilla:monómero funcional:entrecruzador). Cantidad de empaque: 300 mg, acondicionamiento: 15 mL de dicloroetano, carga de 1  $\mu\text{g}$  de flurbiprofeno en 25 mL de dicloroetano, flujo de carga y elución: 1 mL/min, elución: 5 mL de IPA-NaOH 0.1 N (9:1).

Estos resultados tan variables y poco congruentes no permitieron llegar a conclusiones definitivas sobre las condiciones de lavado. Por ejemplo, se esperaba que la cantidad de flurbiprofeno en los eluatos, tanto del cartucho con PIM como del cartucho con polímero blanco (en mayor medida con este último), disminuyera al aumentar la polaridad y el volumen de solvente de lavado, lo cual no fue observado. Además en algunos ensayos se obtuvieron recobros superiores al 100% en el cartucho con PIM, lo que indicaba que el eluyente no había desorbido completamente al soluto retenido en los ciclos precedentes de EFS.

Considerando que el lavado con los disolventes más polares podría estar provocando la oclusión parcial de los poros por contracción del polímero, se decidió analizar en mayor detalle el comportamiento del DCM como solvente de lavado. En la tabla 7 se muestran

los resultados obtenidos en experimentos replicados usando 5 mL de DCM como agente de lavado. Como puede observarse, el recobro del flurbiprofeno en el eluato es más o menos constante entre experimentos. Sin embargo, dada la baja fuerza eluyente del solvente de lavado, no se observan diferencias significativas entre el comportamiento del PIM y del polímero blanco. Es decir, el DCM no es capaz de desorber al soluto, retenido no específicamente, durante la etapa de lavado.

Lavado	Recobro	
	Blanco (µg)	PIM (µg)
5 mL de DCM	0.63	0.60
5 mL de DCM	0.79	0.71
5 mL de DCM	0.67	0.61

Tabla 7. PIM preparado en  $\text{CHCl}_3$  (otras características como en la tabla 6). Acondicionamiento: 15 mL de dicloroetano, carga de 1 µg de flurbiprofeno en 25 mL de dicloroetano, flujo de carga y elución: 1 mL/min, elución: 5 mL de IPA-NaOH 0.1 N (9:1).

En los ensayos de la tabla 7, la recuperación del analito en el cartucho con PIM osciló entre 60 y 70%. El compuesto faltante podría haber sido perdido durante la carga. Para determinar si esta pérdida era debida a una baja capacidad del polímero (número de sitios de adsorción limitados) o a una retención débil que condujo a la fuga del analito al rebasar cierto volumen de carga, se realizaron los experimentos reportados en la tabla 8. Los resultados obtenidos al cargar una cantidad constante de flurbiprofeno (1 µg) en volúmenes crecientes de solución muestran una disminución del recobro, pero ésta no es sistemática. Así, el recobro para volúmenes de 10 y 25 mL de muestra cargada en el PIM es casi idéntico y disminuye ligeramente al aumentar el volumen a 50 mL. Aunque el ensayo con un volumen de 5 mL de muestra da un recobro significativamente mayor que los otros volúmenes, éste pudo ser debido a que a altas concentraciones se favorece la adsorción no específica. De hecho, esto lo confirma el comportamiento del polímero blanco que es más o menos similar al del PIM. De estos resultados se podría concluir que la fuga del analito inicia desde volúmenes de carga muy pequeños, pues en ninguno de los ensayos se obtuvo un recobro del 100%. No obstante, esta aseveración sólo es válida si se asegura que todo el analito retenido en la etapa de carga es desorbido en la etapa de elución.

Carga	Recobro	
	Blanco (µg)	PIM (µg)
1 µg de flurbiprofeno en 5 mL	0.93	0.79
1 µg de flurbiprofeno en 10 mL	0.67	0.56
1 µg de flurbiprofeno en 25 mL	0.58	0.53
1 µg de flurbiprofeno en 50 mL	0.57	0.42
0.25 µg de flurbiprofeno en 25 mL	0.23	0.21
0.5 µg de flurbiprofeno en 25 mL	0.22	0.80
2.0 µg de flurbiprofeno en 25 mL	1.27	1.08

Tabla 8. PIM preparado en  $\text{CHCl}_3$  (otras características como en la tabla 6) Acondicionamiento: 15 mL de dicloroetano, carga de flurbiprofeno disuelto en

dicloroetano, flujo de carga y elución: 1 mL/min, lavado: 5 mL de DCM, elución: 5 mL de IPA-NaOH 0.1 N (9:1).

En lo que concierne a los experimentos realizados con volúmenes de muestra constantes (25 mL) y cantidad de analito variable, los resultados fueron inconsistentes. El recobro para la mínima cantidad cargada (0.25 µg) fue cercano al 90% y disminuyó a 53% para la carga de 1 µg, por lo que podría pensarse que la capacidad del adsorbente fue rebasada en el segundo caso. Sin embargo, al aumentar la cantidad cargada a 2 µg, el % de recobro fue del mismo orden (54 %), lo que equivale a 1 µg de flurbiprofeno retenido. Además, se tuvo un resultado aberrante en el cartucho con PIM, ya que para 0.5 µg cargados, se determinó en el eluato una cantidad de 0.8 µg de flurbiprofeno (160%). Con ello, nuevamente se puso en evidencia que el eluyente utilizado no era todavía el adecuado, pues parte del analito aparentemente se va acumulando en cada ensayo en el adsorbente y, al llegar a cierto nivel, eluye en un experimento dado generando los resultados aberrantes.

En todos los experimentos anteriores, después del lavado con DCM, los cartuchos eran sometidos a un secado por vacío para evitar formación de emulsiones u otros efectos indeseables por incompatibilidad con el eluyente polar. Se pensó que, posiblemente el polímero una vez secado no era capaz de expandirse en la mezcla IPA-NaOH, por lo que este solvente no podía penetrar en los poros para eluir al analito retenido. Se decidió entonces omitir el paso de secado del cartucho y regresar a una mezcla de elución basada en MeOH, pero conteniendo como modificador básico al amoniaco. Se comprobó que el DCM era miscible en la mezcla MeOH-NH<sub>4</sub>OH (0.01 M) 9:1 (v/v). Se decidió dejar por el momento al DCM como agente de lavado, reduciendo el volumen de lavado a 1 mL, puesto que el solvente sólo tenía como función desalojar los remanentes de la solución de carga del volumen intersticial del cartucho.

Por otra parte, para evitar la contaminación cruzada entre experimentos (que a menudo había conducido a recobros mayores al 100%), se estableció un programa de tratamiento de los cartuchos después de cada ciclo de EFS para desalojar cualquier remanente de soluto. La secuencia de solventes en este tratamiento fue: 2 x 5 mL de IPA, 2 x 5 mL de eluyente, 50 mL de agua desionizada y 5 mL de ACN.

Con las nuevas condiciones, se repitieron los experimentos de carga de 1 µg de flurbiprofeno en volúmenes de muestra crecientes. Los resultados se reportan en la tabla 9. La figura 7 permite ver claramente la variación del recobro en función del volumen de carga para el PIM y el polímero blanco.

Volumen de carga	Recobro		Relación PIM/Blanco
	Blanco (µg)	PIM (µg)	
5 mL (0.2 µg/mL)	0.86	1.03	1.2
10 mL (0.1 µg/mL)	0.76	0.83	1.1
25 mL (0.04 µg/mL)	0.30	0.65	2.2
50 mL (0.02 µg/mL)	0.32	0.75	2.3

Tabla 9. PIM preparado en CHCl<sub>3</sub> (otras características como en la tabla 6) Acondicionamiento: 15 mL de dicloroetano, carga de flurbiprofeno disuelto en dicloroetano, flujo de carga y elución: 1 mL/min, lavado: 1 mL de DCM, elución: 2 mL de MeOH-NH<sub>4</sub>OH 0.01 M (9:1).

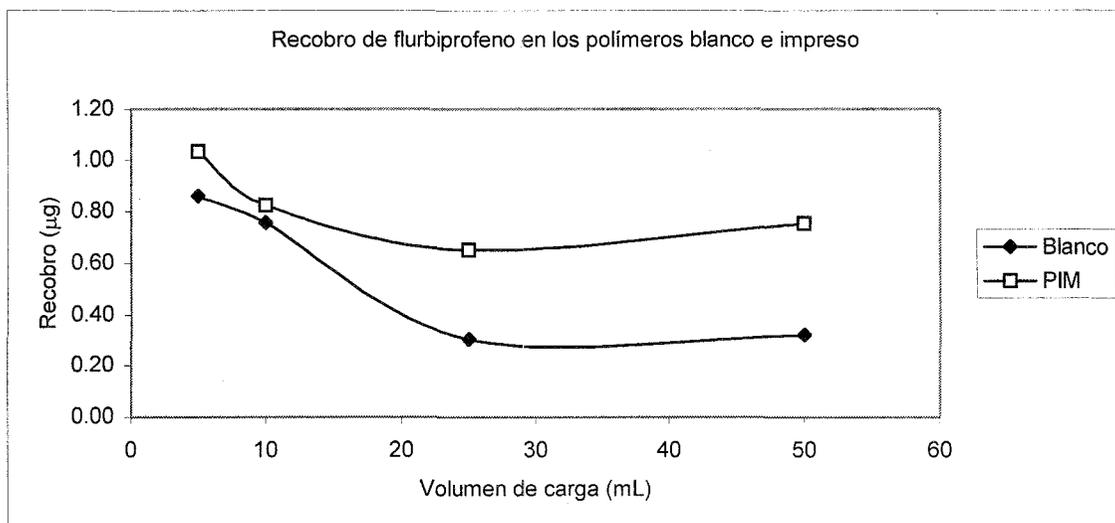


Figura 7. PIM preparado en  $\text{CHCl}_3$  (otras características como en la tabla 6) Acondicionamiento: 15 mL de dicloroetano, carga de flurbiprofeno disuelto en dicloroetano, flujo de carga y elución: 1 mL/min, lavado: 1 mL de DCM, elución: 2 mL de  $\text{MeOH-NH}_4\text{OH}$  0.01 M (9:1).

En este conjunto de experimentos los resultados fueron más coherentes. Como lo muestra la Fig. 7, a bajos volúmenes de carga, es decir, concentraciones más altas, la retención no específica es bastante importante, tanto en el PIM como en el polímero blanco. Al aumentar el volumen de muestra, la cantidad de soluto retenido disminuye llegando a un valor más o menos constante en ambos adsorbentes. En estas condiciones (volúmenes de carga  $\geq 25$  mL) se pone en evidencia la diferencia de comportamiento entre el PIM y el polímero blanco, corroborándose la existencia de sitios de interacción más fuertes en el PIM. Es probable que, en el polímero blanco, la retención del flurbiprofeno sea debida a interacciones con residuos piridina de superficie, dispuestos al azar en la estructura polimérica. Dependiendo de la orientación y accesibilidad de estos grupos, se puede esperar toda una gama de energías de interacción. En el caso del PIM, además de los residuos piridina dispuestos al azar, existen algunos sitios en donde la conformación del esqueleto sólido se adopta a la forma del flurbiprofeno y los residuos piridina de superficie están colocados en posición óptima para interactuar con el grupo carboxilo del soluto impreso. Por lo tanto, en el PIM ocurren simultáneamente interacciones específicas y no específicas, como lo demuestra la relación de retención PIM/Blanco de 2.2-2.3 para volúmenes de carga de 25 y 50 mL. No obstante, no es posible saber a partir de los datos obtenidos, qué fracción del soluto recuperado en el PIM fue retenida por uno u otro tipo de interacción. A modo de ilustración, en la figura 8 se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar en el cromatógrafo los eluatos del PIM y el polímero blanco correspondientes al experimento realizado con un volumen de carga de 25 mL.

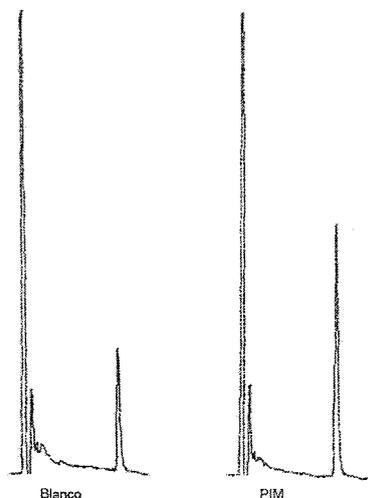


Figura 8. Cromatogramas obtenidos de la inyección de los eluatos del PIM y el polímero blanco para el experimento realizado con un volumen de muestra cargada de 25 mL. Otras condiciones como en la tabla 9. Recobro blanco: 30%. Recobro del PIM: 65%.

Después de los experimentos anteriores, se efectuaron algunos más en los mismos cartuchos empacados con 300 mg de PIM y de polímero blanco. Desafortunadamente, los resultados indicaron que los adsorbentes habían sufrido alguna alteración o daño irreversible pues la retención del flurbiprofeno se redujo notablemente, en particular en el caso del polímero blanco. En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos al comparar al diclorometano y al 1,2-dicloroetano como solventes de carga (o solventes de muestra). Como era de esperarse dada la similitud de estos solventes, no se observan diferencias significativas en la retención del analito al utilizar uno u otro. Por otra parte, en la tabla 11 se reportan resultados de ensayos en los que se varió la velocidad de flujo durante la carga. No se detectó algún efecto significativo de este parámetro sobre la retención del flurbiprofeno; por lo tanto, la pequeña cantidad que se retiene de este soluto no es debida a cuestiones cinéticas.

Disolvente	Recobro		Relación PIM/Blanco
	Blanco ( $\mu\text{g}$ )	PIM ( $\mu\text{g}$ )	
Diclorometano	0.07	0.38	5.4
1,2-dicloroetano	0.09	0.31	3.4

Tabla 10. PIM preparado en  $\text{CHCl}_3$  (otras características como en la tabla 6). Acondicionamiento: 15 mL de dicloroetano, carga 25 mL 0.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de flurbiprofeno, flujo de carga: 1.0 mL/min, lavado: 1 mL de DCM, elución: 2 mL de  $\text{MeOH-NH}_4\text{OH}$  0.01 M (9:1), flujo de la elución: 1.0 mL/min.

Flujo de carga (mL/min)	Recobro		Relación PIM/Blanco
	Blanco ( $\mu\text{g}$ )	PIM ( $\mu\text{g}$ )	
0.5	0.09	0.31	3.4
2.0	0.08	0.39	4.9

Tabla 11. PIM preparado en  $\text{CHCl}_3$  (otras características como en la tabla 6). Acondicionamiento: 15 mL de dicloroetano, carga 25 mL 0.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de flurbiprofeno disuelto en dicloroetano, lavado: 1 mL de DCM, elución: 2 mL de  $\text{MeOH-NH}_4\text{OH}$  0.01 M (9:1), flujo de la elución: 1.0 mL/min.

Como puede verse en las tablas 10 y 11, la retención en el polímero blanco fue casi anulada y en el PIM se redujo aproximadamente a la mitad, con respecto a lo reportado en los experimentos de la tabla 9 para el mismo volumen de carga. No fue posible determinar el origen de la pérdida de retención de los adsorbentes; una posible explicación es que el amoníaco usado en la mezcla de elución haya podido afectar los residuos piridina de la superficie, donde se lleva a cabo la interacción del analito con el adsorbente. En todo caso, el daño fue aparentemente menor en lo que suponemos concierne a las cavidades impresas (o retención específica), como lo muestra el aumento considerable en la relación de retención PIM/Blanco. Coincidentemente, la cantidad de soluto retenido en el PIM en estos últimos ensayos, corresponde aproximadamente a la diferencia entre las curvas de la Figura 7, en la región donde se alcanza un recobro constante.

## V. Conclusiones

Se logró sintetizar un material polimérico que presentó cierto grado de impresión molecular de la plantilla, el flurbiprofeno, utilizando como monómero funcional 4-vinilpiridina y como solvente porogénico  $\text{CHCl}_3$ . En condiciones experimentales apropiadas para minimizar las interacciones no específicas, la capacidad de retención del fármaco en el PIM fue al menos 2.2 veces mayor que en su respectivo blanco.

No obstante, la capacidad de enlazamiento del compuesto de interés por el PIM es todavía realmente baja, por lo que se requiere optimizar la síntesis del material, haciendo más eficiente la formación de cavidades impresas y/o aumentando la proporción de cavidades impresas conectadas a la red de canales y poros de la estructura polimérica y, por tanto, accesibles al soluto.

Un punto crítico en el proceso de extracción en fase sólida con polímeros impresos es la etapa de elución. Una buena parte de este trabajo estuvo dedicada a ensayar diferentes solventes y mezclas para asegurar la completa desorción del analito retenido y evitar la contaminación entre experimentos. Finalmente, con una mezcla  $\text{MeOH-NH}_4\text{OH}$  se logró aparentemente la elución cuantitativa del flurbiprofeno retenido en la etapa de carga. Sin embargo, persiste aún la duda sobre un posible daño en la estructura del polímero a sus sitios de interacción (residuos piridina de superficie) por parte del amoníaco. También es posible que este agente haya bloqueado selectivamente los sitios de unión no específica, en cuyo caso su uso resultaría benéfico al conferir mayor selectividad al PIM. Un estudio profundo y sistemático sobre los efectos del amoníaco en polímeros a base de vinilpiridina queda pendiente para futuras investigaciones.

A pesar de las múltiples dificultades que presenta la síntesis de PIMs, y la puesta a punto de protocolos de EFS para su aplicación analítica, el desarrollo de esos materiales deberá continuar progresando en el futuro próximo, dadas sus interesantes ventajas. Con

respecto a otros materiales de alta selectividad, como los inmunoabsorbentes, los PIMs son mucho más baratos y durables, pueden usarse con solventes orgánicos y son estables a pH extremos.

## VI. Bibliografía

1. Kempe, M. and K. Mosbach. "Direct Resolution of naproxen on a non-covalently molecularly imprinted chiral stationary phase" *J. Chromatography A*. 664 (1994): 276-279.
2. Kempe, M. and K. Mosbach. "Molecular imprinting used for chiral separations" *J. Chromatography A*. 694 (1995): 3-13.
3. Wulff, G. "Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates - A Way towards Artificial Antibodies". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34(1995): 1812-1832.
4. Mayes, A.G. and K. Mosbach. "Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?". *Trends in analytical chemistry*. Vol. 16, no. 6 (1996):321-332.
5. Mosbach, K., and O. Ramström. "The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology". *BioTechnol.* 14 (1996), 163-170.
6. Haupt, K. and K. Mosbach. "Plastic antibodies: developments and applications". *Tibtech*. November (1998), 468-474.
7. Zander, A.; Findlay, P.; Renner, T. and Sellergren, B. "Analysis of nicotine and its oxidation products in Nicotine chewing gum by a molecularly imprinted solid-phase extraction". *Analytical Chemistry*. 70 (1998) 3304-3314.
8. Mullett, W. and Lai, E. "Determination of theophylline in serum by molecularly imprinted solid-phase extraction with pulsed elution". *Analytical chemistry*. 70(1998):3636-3641.
9. Sellergren, B. "Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions". *Trends in analytical chemistry*. Vol. 18, no. 3 (1999):164-174.
10. Andersson, L. I. "Efficient sample pre-concentration of bupivacaine from human plasma by solid-phase extraction on molecularly imprinted polymers". *The Analyst*. 125 (2000): 1515-1517.
11. Andersson, L. I. "Molecular Imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field". *J. Chromatography B*. 745 (2000): 3-13.
12. Andersson, L. I. "Molecular Imprinting for drug bioanalysis. A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay". *J. Chromatography B*. 739 (2000): 163-173.
13. Chen, W.; Liu, F.; Xu, Y.; Li, K. and Tong, S. "Molecular recognition of procainamide-imprinted polymer". *Analytica Chimica Acta*. 432 (2001) 277-282.1. Haupt, K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *The Analyst*. 126 (2001), 747-756.
14. Masqué, N., Marcé, R.M. and Borrull, F. "Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction". *Trends in analytical chemistry*. Vol. 20, no. 9 (2001):477-485.
15. Andersson, L. I. "Selective solid-phase extraction of bio- and environmental samples using molecularly imprinted polymers". *Bioseparation*. 10 (2002): 353-364.
16. Ensing, K., Berggren, C. and Majors, R. "Selective Sorbents for Solid-Phase Extraction. Based on Molecularly Imprinted Polymers". *LC GC Europe*. January 2002, 2-8.
17. Theodoridis, G. and Manesiotis, P. "Selective solid phase extraction sorbent for caffeine made by molecular imprinting" *J. Chromatography A*. 948 (2002): 163-169.
18. Komiyama, M.; Takeushi, T.; Mukawa, T. and Asanuma, H. "Molecular Imprinting. From Fundamentals to Applications". Ed. Wiley-VCH. Alemania. 2003. pp. 147.