

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

FACULTAD DE QUÍMICA

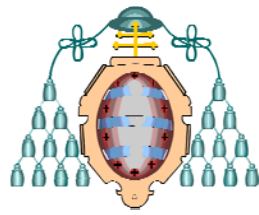
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

DISEÑO COMPUTACIONAL DE
RECEPTORES DE AFINIDAD BASADOS
EN POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS
PARA SENSORES ELECTROQUÍMICOS

TESIS DOCTORAL

2008

YOLANDA DIÑEIRO GARCÍA



Reservados todos los derechos
© El autor

Edita: Universidad de Oviedo,
Biblioteca Universitaria, 2009
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 62

ISBN 978-84-692-8946-4
D.L.: AS.02296-2009

En octubre de 2002 comenzaba mi carrera investigadora, la que sin duda es una carrera de fondo para todos los doctorandos, un camino sinuoso y plagado de trabas. Empezando por una falta de apoyo institucional, de incentivos y quizá la más frustrante: una clara falta de perspectivas futuras una vez finalizada la Tesis Doctoral.

Sin embargo, y por encima de todos los inconvenientes, la satisfacción del trabajo realizado en campos pioneros y la apertura de nuevas vías de investigación que otros doctorandos finalizarán, permiten culminar esta Tesis con una sonrisa mezcla de alegría, ilusión, y nostalgia.

La lectura de esta Tesis Doctoral es consecuencia no sólo del trabajo propio de la autora, sino de la aportación de numerosas personas a las que les agradezco con estas letras su esfuerzo y dedicación.

En primer lugar quiero dar las gracias al Pr. Paulino Tuñón por la oportunidad que me ha ofrecido al poder realizar los estudios de doctorado en su grupo de investigación.

Al Dr. Arturo José Miranda por sus impagables ideas, su positivismo, su cariño y dedicación.

A la Dra. Carmen Blanco por su apoyo, su interés y útil capacidad de organización.

Y a la Dra. María Jesús Lobo, por su pragmatismo a la hora de orientar este trabajo.

Finalmente, y no por última menos importante, a la Dra. Isabel Menéndez Rodríguez he de agradecerle su disposición, su infinita paciencia conmigo y por supuesto sus impagables enseñanzas de Química Cuántica sin las cuales esta Tesis no se podría haber escrito.

También debo dar las gracias al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión de una beca predoctoral FPU, así como al Hospital Central de Asturias por el suministro de muestras biológicas.

Mención aparte merece mi familia sin la cual hubiera sido muy difícil la culminación de este trabajo. Gracias papá, mamá y guelitos.

Tampoco me quiero olvidar de mis amigos y amigas de la Facultad. A mis compañeras de laboratorio: Goretti, Rebeca, Noemi, Eva. Y a Inma, María y Rocío.

Por último, a todo aquel que crea que deba estar en estos agradecimientos y que por despiste de la autora no haya citado.

Gracias

*“ Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
Y pensar lo que nadie más ha pensado ”*

Albert Szent-Györgi (1893-1986)

Bioquímico húngaro-estadounidense

(Premio Nobel de Fisiología y Medicina - 1937)

Resumen

Las investigaciones realizadas han permitido desarrollar un método para el diseño racional de polímeros molecularmente impresos (MIPs) no covalentes basado en cálculos del Funcional de la Densidad (DFT) de la energía de estabilización del aducto de prepolimerización formado por la molécula molde (ácido homovanílico o HVA) y los monómeros funcionales: ácido 2-trifluorometacrílico (TFMAA), ácido metacrílico (MAA), 2-metacrilamida (MA) y 4-vinilpiridina (VPY) en seis disolventes de distinta constante dieléctrica: tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo, dimetilsulfóxido y agua. El modelo parte de la hipótesis de que la combinación de monómero funcional y disolvente porogénico que lleve a la menor energía de estabilización del aducto conducirá al mejor receptor polimérico. El efecto del disolvente se incluyó utilizando el modelo del Continuo Polarizado.

Los resultados obtenidos a partir del cálculo en disolución permiten concluir que el tolueno es el disolvente que conduce a complejos más estables para todos los monómeros funcionales. En este disolvente, TFMAA es el monómero que tiene una energía de Gibbs de estabilización más elevada con HVA (-17.1 kcal/mol).

Esta selección teórica de disolvente y monómero funcional se validó experimentalmente sintetizando MIPs en forma particulada, y comprobando su reconocimiento molecular mediante ensayos de unión. Con este fin, se manejaron diversos modelos matemáticos (isotermas de adsorción de Langmuir, Freundlich, y Langmuir-Freundlich). Utilizando el modelo de Freundlich, que fue el que mejor se ajustó a los resultados experimentales, se obtuvieron para el MIP una constante de afinidad promedio de $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y un número de sitios de unión promedio de 13 $\mu\text{mol/g}$.

Además, la validez de las predicciones teóricas se comprobó mediante la construcción de un sensor voltamétrico para HVA. Para esto, se emplearon electrodos de carbono vitrificado modificados con una fina película de polímero impreso sintetizado mediante recubrimiento bajo rotación y polimerización fotoquímica. A partir del monómero funcional y disolvente óptimo predicho por el método computacional se obtuvieron sensores con buenas propiedades de reconocimiento. La señal del HVA se registró, tras una incubación del electrodo modificado en tolueno, mediante voltametría diferencial de pulso en un medio exento de analito (citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 con un 40% de acetonitrilo). Con los sensores construidos se obtuvo un intervalo dinámico lineal de tres órdenes de magnitud (10^{-8} - 10^{-5} M) y un límite de detección de 1.6×10^{-8} M.

Se realizaron estudios empleando un electrodo de disco rotatorio para determinar el área efectiva del electrodo y la permeabilidad de la capa polimérica. Se obtuvieron valores de permeabilidad del orden de 10^{-5} cm²/s para el electrodo modificado con polímero impreso y en todos los casos estos valores fueron superiores a los obtenidos con el no impreso. La permeabilidad aparente en la capa es un orden de magnitud mayor que los coeficientes de difusión calculados para HVA en disolución. Este hecho refuerza la hipótesis de que existe un mecanismo de reparto entre la disolución y la película polimérica. En consecuencia, se puede afirmar que el mecanismo de respuesta del sensor se basa en la preconcentración del HVA en la capa polimérica en el disolvente óptimo (tolueno), transferencia a otro disolvente que favorezca su liberación de los sitios de unión y, por último, difusión desde los sitios de unión a la superficie del electrodo.

El estudio de selectividad realizado mediante cálculos DFT con análogos estructurales del ácido homovanílico: ácido vanillilmandélico (VMA), ácido isovanillilmandélico (IVMA), ácido isohomovanílico (IHVA), alcohol homovanílico (MHPE) y ácido indolacético (IAA) indica que la formación de un doble puente de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la molécula de prueba y el grupo carboxilo del sitio de unión es la interacción que determina el proceso de reconocimiento molecular.

Los experimentos de reactividad cruzada realizados tanto con material particulado como con el sensor corroboran la validez de estas predicciones teóricas.

El estudio teórico con moléculas potencialmente interferentes al HVA en muestras de orina, entre las que se encuentran análogos estructurales de carácter básico: dopamina, epinefrina, norepinefrina, metanefrina y normetanefrina y análogos de carácter ácido: VMA, IHVA, MHPE e IAA, muestra que, exceptuando MHPE, todos los metabolitos estudiados podrían competir con el HVA por los sitios de unión al sensor.

Por último, se desarrolló un método analítico para la determinación de HVA en orina empleando el sensor construido. En todos los análisis realizados se obtuvieron valores en exceso de la concentración de analito en las muestras. Estos resultados podrían justificarse teniendo en cuenta que el método computacional también permitió predecir la interferencia de varios compuestos endógenos de la matriz de la orina.

Para finalizar, se concluye que el método computacional basado en cálculos DFT desarrollado en este trabajo puede emplearse para resolver problemas cruciales en el campo de la impresión molecular, como son la selección del mejor monómero funcional, el mejor disolvente, el mejor medio de incubación, e incluso predecir la selectividad del polímero sintetizado, reduciendo de esta manera gran número de etapas de experimentación.

Índice

Lista de abreviaturas	xxiii
1.- Introducción.....	1
1.1.- Principios generales de la impresión molecular	2
A. Moléculas molde.....	5
B. Matriz polimérica	5
1.2.- Diseño racional de un elemento de reconocimiento para ácido homovanílico. Problemática.....	6
1.3.- Selección de la molécula molde	8
2.- Objetivos	11
3.- Métodos de cálculo.....	15
3.1.- Métodos <i>ab-initio</i>	15
3.1.1.- Método SCF	15
3.1.2.- Funciones de base	19
3.1.3.- Energía de correlación	21
3.2.- Teoría del funcional de la densidad (DFT)	21
3.3.- Termodinámica estadística	25
3.4.- El efecto del disolvente.....	26
3.5.- Nivel de cálculo utilizado y energías de estabilización	27
4.- Desarrollo de un método computacional para el diseño de un polímero impreso para ácido homovanílico	29
4.1.- Antecedentes.....	29
4.2.- Desarrollo del método computacional. Selección del mejor monómero funcional y del mejor disolvente	33
4.2.1.- Geometría y energía electrónica de la molécula molde (HVA).....	33
4.2.2.- Interacción HVA-TFMAA.....	34
A. Energías electrónicas de estabilización	37
B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas.....	38

C.	Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos HVA-TFMAA	40
D.	Estudio de las interacciones de moléculas de agua con la molécula molde (HVA) y el monómero (TFMAA)	42
4.2.3.-	Interacción HVA-MA.....	43
A.	Energías electrónicas de estabilización	46
B.	Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas.....	48
C.	Influencia de los disolventes en la estabilización de los complejos HVA-MA	49
D.	Estudio de las interacciones de moléculas de agua con la molécula molde (HVA) y el monómero (MA).....	50
4.2.4.-	Interacción HVA-MAA.....	51
A.	Energías electrónicas de estabilización	54
B.	Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas.....	56
C.	Influencia de los disolventes en la estabilización de los complejos HVA-MAA.....	57
D.	Estudio de las interacciones de moléculas de agua con la molécula molde (HVA) y el monómero (MAA)	58
4.2.5.-	Interacción HVA-VPY.....	59
A.	Energías electrónicas de estabilización	61
B.	Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas.....	62
C.	Influencia de los disolventes en la estabilización de los complejos HVA-VPY	62

D.	Estudio de las interacciones de moléculas de agua con la molécula molde (HVA) y el monómero (VPY)	63
4.2.6.-	Selección del mejor monómero	64
4.2.7.-	Interacciones 1-2	66
A.	Energías electrónicas de estabilización.....	68
B.	Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas	69
C.	Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos 1-2	70
4.2.8.-	Interacciones HVA-EGDMA.....	71
A.	Energías electrónicas de estabilización.....	72
B.	Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas	74
C.	Influencia de los disolventes en la estabilización de los complejos HVA y EGDMA	74
4.2.9.-	Energía de interacción entre monómero funcional, molécula molde y disolvente. Aplicación a la selección del disolvente de lavado y de incubación.....	75
4.3.-	Predicciones teóricas de reactividad cruzada.....	78
4.3.1.-	Reactividad cruzada con análogos estructurales de carácter ácido	78
4.3.1.1.-	Interacciones 1-1.....	80
A.	Energías electrónicas de estabilización.....	81
B.	Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas	82
C.	Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos 1-1	83
4.3.1.2.-	Interacciones 1-2.....	84
A.	Energías electrónicas de estabilización.....	86

B.	Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas.....	86
C.	Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos 1-2.....	87
4.3.2.-	Reactividad cruzada con compuestos de carácter básico	88
4.3.2.1.-	Interacciones 1-1.....	90
4.3.2.2.-	Interacciones 1-2.....	93
5.-	Instrumentación, reactivos y procedimientos experimentales.....	99
5.1.-	Instrumentación	99
5.1.1.-	Electrodos de trabajo	99
5.1.2.-	Instrumentación utilizada en la preparación de sensores voltamétricos basados en MIPs	100
5.2.-	Reactivos	102
5.3.-	Procedimientos experimentales	103
5.3.1.-	Preparación de la superficie de los electrodos de trabajo.....	103
5.3.2.-	Preparación de MiPs en pequeña escala (mini-MiPs) ..	104
Ensayos de unión.....		105
5.3.3.-	Preparación de MIPs en forma de monolito	106
Ensayos de unión.....		107
5.3.4.-	Preparación de los electrodos modificados	108
Mezcla de prepolimerización		108
Protocolo de medida		109
5.3.5.-	Preparación de las muestras de orina	111
A.	Extracción líquido-líquido para la eliminación de interferentes.....	111
B.	Eliminación de interferentes mediante cartuchos de extracción en fase sólida (C18)	111

C.	Eliminación de interferentes mediante cartuchos de extracción en fase sólida con un intercambiador aniónico fuerte (SAX).....	112
6.-	Evaluación de la capacidad de enlace del MIP mediante ensayos de unión	113
6.1.-	Antecedentes.....	113
6.1.1.-	Métodos de evaluación de la afinidad.....	113
6.1.2.-	Modelos de enlace.....	115
6.1.2.1.-	Modelos de enlace discretos	117
6.1.2.2.-	Modelos de enlace continuos	118
A.	Isoterma de Freundlich	119
B.	Isoterma de Langmuir-Freundlich.....	122
6.2.-	Detección voltamétrica de ácido homovanílico con electrodos de pasta de carbono	124
6.3.-	Selección de las condiciones de polimerización	128
6.3.1.-	Selección del tipo de iniciador y procedimiento de polimerización.....	129
6.3.2.-	Selección del disolvente porogénico	130
6.3.3.-	Selección del monómero funcional.....	130
6.4.-	Caracterización del proceso de impresión molecular mediante isothermas de adsorción	131
6.4.1.-	Selección de la concentración de polímero.....	132
6.4.2.-	Estudio de la influencia del disolvente porogénico	133
6.4.3.-	Estudio de la influencia del disolvente de incubación .	134
6.4.4.-	Ensayos de unión	135
6.4.5.-	Análisis de las isothermas de adsorción.....	137
6.4.6.-	Distribuciones de afinidad (DA)	139
6.4.7.-	Estudio de selectividad	142
7.-	Construcción de un sensor voltamétrico para ácido homovanílico.....	149
7.1.-	Antecedentes.....	149

7.1.1.-	Sensores electroquímicos basados en el reconocimiento molecular por polímeros impresos.	149
7.1.2.-	Elementos de reconocimiento y tipos de transducción	150
7.1.3.-	Estrategias de integración transductor electroquímico-MIP	158
A.	Integración con material particulado	158
B.	Integración a través de películas poliméricas	160
7.1.4.-	Características analíticas.....	162
A.	Límites de detección	162
B.	Selectividad	162
C.	Reproducibilidad.....	163
D.	Aplicación a muestras reales.....	163
E.	Tiempo de respuesta. Estabilidad del sensor a largo plazo	164
7.2.-	Oxidación electroquímica del ácido homovanílico sobre electrodos de carbono vitrificado	165
7.3.-	Electrodos modificados con polímeros molecularmente impresos para ácido homovanílico.....	167
7.3.1.-	Optimización de la respuesta del sensor.....	167
A.	Efecto del tiempo bajo radiación UV antes de la rotación ($t (UV)$) en la capacidad de reconocimiento de la capa.....	167
B.	Proporciones en la mezcla de prepolimerización	172
C.	Optimización del disolvente porogénico	173
D.	Optimización del monómero funcional	175
E.	Efecto de agentes retardantes de la polimerización	177
F.	Optimización del tiempo de incubación.....	184
G.	Selección del disolvente de lavado	184

7.3.2.- Relación de señales MIPE/NIPE en las condiciones seleccionadas.....	185
7.3.3.- Estudio electroquímico de la permeabilidad de las capas poliméricas con electrodo de disco rotatorio ...	186
A. Fundamento.....	186
B. Caracterización del proceso de electrodo	191
C. Cálculo del área efectiva del electrodo y coeficiente de difusión de HVA, cloruro de hexaaminrutenio (III) y ferricianuro potásico en disolución.....	193
D. Estudio de la permeabilidad de la capa	195
E. Comportamiento diferencial MIPE/NIPE	197
7.3.4.- Calibración	201
7.3.5.- Reactividad cruzada	204
7.3.6.- Estabilidad operacional, conservación y vida útil del electrodo.....	207
7.3.7.- Repetitividad y reproducibilidad.....	208
7.4.- Análisis de HVA en orina	209
7.4.1.- Introducción	209
7.4.2.- Análisis directo de orina con un electrodo de carbono vitrificado sin modificar (GCE) por voltametría diferencial de pulso (DPV).....	210
7.4.3.- Análisis directo de orina con un electrodo modificado con polímero molecularmente impreso (MIPE) por DPV	212
7.4.4.- Extracción líquido-líquido de catecolaminas y eliminación de interferentes	214
A. Recuperación	215
B. Análisis de HVA en orina de voluntarios sanos.....	215
C. Análisis de HVA en orina de pacientes	216

7.4.5.- Eliminación de interferentes mediante cartuchos de extracción en fase sólida de intercambio aniónico fuerte (SAX)	217
A. Recuperación	217
B. Análisis de HVA en orina de voluntarios sanos	218
C. Análisis de HVA en orina de pacientes	218
7.4.6.- Eliminación de interferentes mediante cartuchos de extracción en fase sólida C18.....	219
A. Recuperación	219
B. Análisis de HVA en orina de voluntarios sanos	220
C. Análisis de HVA en orina de pacientes	220
7.4.7.- Conclusión	222
8.- Conclusiones.....	223
Sugerencias para trabajos futuros.....	229
Bibliografía.....	233
Anexo I: Publicaciones derivadas de esta tesis doctoral	251
Anexo II: Tablas.....	267

Índice de tablas

Tabla 4.1.- Energías electrónicas de los diez complejos HVA-TFMAA más estables.....	37
Tabla 4.2.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-TFMAA..	39
Tabla 4.3.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-TFMAA en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo y agua.....	41
Tabla 4.4.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-dímero H ₂ O, TFMAA-dímero H ₂ O y HVA-TFMAA en agua.....	43
Tabla 4.5.- Energías electrónicas de los diez complejos HVA-MA más estables.....	47
Tabla 4.6.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-MA.....	48
Tabla 4.7.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-MA en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo y agua.....	49
Tabla 4.8.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-dímero H ₂ O, MA-dímero H ₂ O y HVA-MA en agua.....	51
Tabla 4.9.- Energías electrónicas de los diez complejos HVA-MAA más estables.....	55
Tabla 4.10.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-MAA.....	56
Tabla 4.11.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-MAA en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo y agua.....	57
Tabla 4.12.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-dímero H ₂ O, MAA-dímero H ₂ O y HVA-MAA en agua..	59
Tabla 4.13.- Energías electrónicas de los tres complejos HVA-VPY más estables.....	61
Tabla 4.14.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-VPY.....	62

Tabla 4.15.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-VPY en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo y agua.....	63
Tabla 4.16.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-dímero H ₂ O, VPY-dímero H ₂ O y HVA-VPY en agua....	64
Tabla 4.17.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-TFMAA, HVA-MAA, HVA-MA y HVA-VPY más estables en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo, agua y DMSO.....	65
Tabla 4.18.- Energías electrónicas de los complejos HVA-2TFMAA, HVA-2MA, HVA-2MAA y HVA-2VPY más estables.....	68
Tabla 4.19.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos t1-2 , ma1-2 , m1-2 y v1-2	69
Tabla 4.20.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-2TFMAA, HVA-2MA, HVA-2MAA y HVA-2VPY más estables en los disolventes tolueno, cloroformo, acetonitrilo, diclorometano, agua y DMSO.....	70
Tabla 4.21.- Energías electrónicas de los complejos HVA-EGDMA más estables.....	73
Tabla 4.22.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-EGDMA.	74
Tabla 4.23.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-EGDMA en los disolventes tolueno, cloroformo y acetonitrilo.....	75
Tablas 4.24 y 4.25.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-disolvente y TFMAA-disolvente en fase gas y en disolución.....	76
Tabla 4.26.- Energías electrónicas de los complejos 1-1 TFMAA-molécula de prueba más estables.....	81
Tabla 4.27.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG de los complejos 1-1 TFMAA-molécula de prueba más estables en fase gas.....	82

Tabla 4.28.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos 1-1 TFMAA-molécula de prueba más estables en tolueno.....	83
Tabla 4.29.- Energías electrónicas de los complejos 1-2 molécula de prueba-TFMAA más estables.....	86
Tabla 4.30.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG de los complejos 1-2 molécula de prueba-TFMAA más estables en fase gas.....	87
Tabla 4.31.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos 1-2 molécula de prueba-TFMAA más estables en tolueno.....	88
Tabla 4.32.- Energías electrónicas de los complejos 1-1 TFMAA-molécula interferente más estables.....	91
Tabla 4.33.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG de los complejos 1-1 TFMAA-molécula interferente más estables en fase gas.....	92
Tabla 4.34.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos 1-1 TFMAA-molécula interferente más estables en tolueno.....	93
Tabla 4.35.- Energías electrónicas de los complejos 1-2 molécula interferente-TFMAA más estables.....	95
Tabla 4.36.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG de los complejos 1-2 molécula interferente-TFMAA más estables en fase gas.....	96
Tabla 4.37.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos 1-2 molécula interferente-TFMAA más estables en tolueno.....	97
Tabla 6.1.- Porcentaje de retención (B/T) para MIP y NIP y relación de porcentajes MIP/NIP para los tres monómeros ensayados: TFMAA, MAA y MA.....	131
Tabla 6.2.- Ecuaciones de ajuste de MIP y NIP a la isoterma de Freundlich.....	137
Tabla 6.3.- Parámetros de ajuste de MIP y NIP para las isotermas de adsorción de Langmuir, Langmuir-Freundlich y Freundlich	138
Tabla 7.1.- Sensores electroquímicos basados en MIPs de forma particulada de base acrílica o vinílica.....	152
Tabla 7.1.- Continuación.....	153

Índice de tablas

Tabla 7.2.-	Sensores electroquímicos basados en MIPs de base acrílica o vinílica preparados como películas.....	154
Tabla 7.2.-	Continuación.....	155
Tabla 7.3.-	Intensidades de corriente obtenidas para MIPE y NIPE sintetizados con distinto monómero funcional y disolvente porogénico e incubados en una disolución de HVA de concentración 5×10^{-5} M en tolueno y DMSO.....	176
Tabla 7.4.-	Valores tabulados de coeficientes de difusión en disolución para el par reversible ferro/ferricianuro potásico de concentración 1 mM en KCl 0.1 M a 25°C.....	194
Tabla 7.5.-	Área efectiva del electrodo de carbono vitrificado sin modificar y coeficientes de difusión en disolución para HVA, cloruro de hexaaminrutenio (III) y ferricianuro potásico en una reguladora de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 con un 40% de acetonitrilo.....	195
Tabla 7.6.-	Comparación de las permeabilidades de MIPE y NIPE sintetizados en las mismas condiciones para un valor de t (UV) de un minuto según los dos métodos estudiados (Koutecky-Levich y procedimiento iterativo).....	200
Tabla 7.7.-	Recuperaciones obtenidas con un sensor sintetizado a un t (UV) de un minuto para el procedimiento de extracción en cloroformo.....	215
Tabla 7.8.-	Resumen comparativo de las concentraciones de HVA obtenidas mediante HPLC y con el sensor basado en polímeros molecularmente impresos.....	216
Tabla 7.9.-	Recuperaciones obtenidas con un sensor sintetizado a un t (UV) de un minuto para el procedimiento de extracción en cartucho de extracción en fase sólida SAX.....	217

Tabla 7.10.- Resumen comparativo de las concentraciones de HVA obtenidas mediante HPLC y con el sensor basado en polímeros molecularmente impresos..... 218

Tabla 7.11.- Recuperaciones obtenidas con un sensor sintetizado a un t (UV) de un minuto para el procedimiento de extracción en cartucho de extracción en fase sólida C18..... 219

Tabla 7.12.- Resumen comparativo de las concentraciones de HVA obtenidas mediante HPLC y con el sensor basado en polímeros molecularmente impresos..... 220

Índice de figuras

Figura 1.1.-	Proceso de impresión molecular con polímeros acrílicos..	3
Figura 1.2.-	Estructura molecular del ácido homovanílico.....	8
Figura 4.1.-	Geometría optimizada del HVA.....	33
Figura 4.2.-	Geometría optimizada del TFMAA.....	34
Figura 4.3.-	Geometrías optimizadas de los complejos HVA.....	36
Figura 4.4.-	Geometrías optimizadas de los complejos más estables para TFMAA y HVA interaccionando con dímeros de agua.....	42
Figura 4.5.-	Geometría optimizada de MA.....	44
Figura 4.6.-	Geometrías optimizadas de los complejos HVA-MA localizados.....	46
Figura 4.7.-	Geometrías optimizadas de los complejos más estables para MA y HVA interaccionando con dos moléculas de agua.....	50
Figura 4.8.-	Geometría optimizada del MAA.....	52
Figura 4.9.-	Geometrías optimizadas de los complejos HVA-MAA localizados.....	54
Figura 4.10.-	Geometrías optimizadas de los complejos más estables para MAA y HVA interaccionando con dímeros de agua..	58
Figura 4.11.-	Geometría optimizada de VPY.....	60
Figura 4.12.-	Geometrías optimizadas de los complejos HVA-VPY localizados.....	60
Figura 4.13.-	Geometrías optimizadas de los complejos más estables para VPY y HVA interaccionando con dímeros de agua...	63
Figura 4.14.-	Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por una molécula de HVA y dos moléculas de monómero funcional TFMAA (t1-2), MA (ma1-2), MAA (m1-2) y VPY (v1-2).....	67

Figura 4.15.- Geometrías optimizadas de los complejos HVA-EGDMA localizados.....	72
Figura 4.16.- Estructuras de las moléculas de prueba de carácter ácido para la evaluación de la interacción con el monómero funcional.....	79
Figura 4.17.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por una molécula de monómero funcional TFMAA y una molécula de HVA, IHVA, VMA, IVMA, MHPE e IAA, respectivamente.....	81
Figura 4.18.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por dos moléculas de monómero funcional TFMAA y una molécula de HVA, IHVA, VMA, IVMA, MHPE e IAA, respectivamente.....	85
Figura 4.19.- Estructuras de moléculas de carácter básico potencialmente interferentes del HVA.....	89
Figura 4.20.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por una molécula de monómero funcional TFMAA y una molécula de dopamina, epinefrina, norepinefrina, metanefrina y normetanefrina, respectivamente.....	90
Figura 4.21.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por dos moléculas de monómero funcional TFMAA y una molécula de dopamina, epinefrina, norepinefrina, metanefrina y normetanefrina, respectivamente.....	94
Figura 5.1.- (a) Imagen de la cámara de polimerización con el criostato y el rotor de velocidad controlada; (b) vista superior del dispositivo utilizado.....	101

Figura 5.2.-	Secuencia de etapas de medida para un electrodo modificado con polímero molecularmente impresos.....	110
Figura 6.1.-	Modelos de distribución de sitios de unión discretos.....	116
Figura 6.2.-	Modelo de distribución de afinidad propuesto para los MIPs.....	117
Figura 6.3.-	Representación de Scatchard para el modelo bi-Langmuir. K_1 y N_1 representan los sitios de menor afinidad y K_2 y N_2 los de menor afinidad.....	118
Figura 6.4.-	Voltamperograma cíclico obtenido a una concentración de HVA de 2×10^{-4} M en citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10.....	124
Figura 6.5.-	(Tablas, T-1). Variación del potencial de pico para el proceso O_1 con el pH.....	126
Figura 6.6.-	(Tablas, T-2). Variación de la intensidad de corriente del proceso O_1 con el pH.....	126
Figura 6.7.-	(Tablas, T-4). Gráfica de calibración para HVA obtenida con un electrodo de pasta de carbono mediante voltametría diferencial de pulso.....	128
Figura 6.8.-	(Tablas, T-5). Representación del porcentaje de enlace (B/T) en función de la concentración de polímero para MIP y NIP sintetizados e incubados en tolueno, a una concentración constante de HVA de 1×10^{-4} M.....	132
Figura 6.9.-	(Tablas, T-6). Representación del porcentaje de enlace (B/T) en función de la concentración de polímero para un MIP sintetizado e incubado en tolueno y un MIP sintetizado e incubado en acetonitrilo a una concentración constante de HVA de 1×10^{-4} M.....	134
Figura 6.10.-	(Tablas, T-7). Isotherma de adsorción experimental para MIP y NIP.....	137

Figura 6.11.- (Tablas, T-8). (a) y (b) corresponden a las distribuciones de afinidad global para la ILF en formato semilogarítmico y logarítmico respectivamente en todo el rango de afinidades. (c) es la misma distribución limitada por K_{\max} y K_{\min}	140
Figura 6.12.- (Tablas, T-9). (a) y (b) corresponden a las distribuciones de afinidad para la IF en formato semilogarítmico y logarítmico respectivamente en el rango de afinidades limitado por K_{\max} y K_{\min}	141
Figura 6.13.- Estructuras de las moléculas de prueba para la evaluación de la selectividad.....	144
Figura 6.14.- (Tablas, T-10). Representación del porcentaje de enlace (B/T) de las distintas moléculas ensayadas para una concentración de molécula de prueba de 1×10^{-4} M y una concentración de MIP y NIP de 10 mg/mL.....	145
Figura 6.15.- Voltamperograma diferencial de pulso obtenido a partir de una disolución patrón de MHPE de concentración 1×10^{-4} M y a partir del sobrenadante de una incubación del MIP realizada con 1×10^{-4} M de MHPE en tolueno.....	147
Figura 7.1.- Voltamperograma cíclico obtenido para una concentración de HVA 2×10^{-4} M en citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10.....	165
Figura 7.2.- (Tablas, T-11). Gráfica de calibración para HVA obtenida con un electrodo de carbono vitrificado mediante voltametría diferencial de pulso.....	166
Figura 7.3.- Imágenes de capas de polímero impreso para HVA sintetizadas sobre la superficie de un electrodo de carbono vitrificado a diferentes t (UV) obtenidas por microscopía óptica.....	168

Figura 7.4.- (Tablas, T-12).- Efecto de t (UV) en el espesor de la capa.....	169
Figura 7.5.- Imagen obtenida por microscopía óptica de la superficie de una capa de polímero impreso sintetizada sobre un electrodo de carbono vitrificado para un t (UV) de 3 min	170
Figura 7.6.- (Tablas, T-13).- Curvas de respuesta para tres MIPes sintetizados a distintos t (UV).....	171
Figura 7.7.- Curvas de respuesta para tres MIPes sintetizados a t (UV) distintos para la zona de concentraciones de HVA más bajas.....	172
Figura 7.8.- (Tablas, T-14).- Representación semi-logarítmica de los calibrados para dos electrodos modificados con polímero molecularmente impreso sintetizados en tolueno.....	173
Figura 7.9.- (Tablas, T-15). Variación de la intensidad de corriente de un electrodo modificado con polímero molecularmente impreso (MIPE) y un electrodo modificado con polímero no impreso (NIPE) sintetizados a un valor de t (UV) de un minuto frente al tiempo de lavado en acetonitrilo.....	174
Figura 7.10.- (Tablas, T-17).- Gráficas de calibración obtenidas mediante voltametría diferencial de pulso para dos MIPes sintetizados con TFMAA y MAA en tolueno.....	177
Figura 7.11.- (Tablas, T-18).- Influencia del porcentaje de isooctano en el t (UV) necesario para iniciar la polimerización.....	178
Figura 7.12.- (Tablas, T-19).- Influencia del porcentaje de polivinilacetato (PVAC) en el t (UV) necesario para iniciar la polimerización.....	179

Figura 7.13.- (Tablas, T-20).- Variación de la intensidad de corriente con el porcentaje peso/volumen de polivinilacetato (PVAC) para una capa sintetizada con diglyme como disolvente porogénico.....	180
Figura 7.14.- (Tablas, T-21).- Variación de la intensidad de corriente con el porcentaje de isooctano para una capa sintetizada con diglyme como disolvente porogénico.....	181
Figura 7.15.- (Tablas, T-22).- Variación de la intensidad de corriente con el porcentaje de isooctano para una capa sintetizada con tolueno como disolvente porogénico.....	182
Figura 7.16.- (Tablas, T-23).- Variación de la intensidad de corriente con la naturaleza del disolvente de incubación para capas sintetizadas en tolueno.....	183
Figura 7.17.- (Tablas, T-24).- Variación de la intensidad de corriente de un MIPE sintetizado a un t (UV) de un minuto con el tiempo de incubación en tolueno para una concentración de HVA de 5×10^{-5} M.....	184
Figura 7.18.- Voltamperograma diferencial de pulso obtenido con un MIPE y un NIPE en una reguladora de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 exenta de HVA con un 40% de acetonitrilo, previa etapa de incubación en una disolución de HVA de concentración 5×10^{-5} M en tolueno.....	185
Figura 7.19.- (Tablas, T-25).- Variación de la intensidad de pico anódico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potenciales a una concentración de HVA de 0.1 M.....	192
Figura 7.20.- Cronoamperogramas obtenidos para un MIPE sintetizado tras un minuto de t (UV) en presencia de tres niveles de concentración de HVA: 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M y 2.5×10^{-4} M.....	196

Figura 7.21.- (Tablas, T-26).- Representación del inverso de las intensidades de corriente de difusión frente al inverso de la raíz cuadrada de la velocidad de rotación para tres MIPEs de la misma composición sintetizados a tres t (UV) distintos.....	197
Figura 7.22.- Cronoamperogramas obtenidos en un medio de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 para MIPE y NIPE sintetizados con un valor de t (UV) de un minuto en presencia de HVA de concentración 5×10^{-4} M.....	198
Figura 7.23.- Cronoamperogramas obtenidos en un medio de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 para MIPE y NIPE sintetizados con un valor de t (UV) de un minuto en presencia de ferricianuro potásico de concentración 1×10^{-3} M.....	199
Figura 7.24.- Cronoamperogramas obtenidos en un medio de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 para MIPE y NIPE sintetizados con un valor de t (UV) de un minuto en presencia de cloruro de hexaaminrutenio (III) de concentración 1×10^{-3} M.....	199
Figura 7.25.- (Tablas, T-27).- Gráficas de calibración obtenidas mediante voltametría diferencial de pulso para MIPE.....	202
Figura 7.26.- (Tablas, T-28).- Gráfica de calibración en formato semilogarítmico obtenida mediante voltametría diferencial de pulso para un MIPE sintetizado a un valor de t (UV) de un minuto.....	203
Figura 7.27.- Estructuras de las moléculas de prueba para la evaluación de la selectividad.....	204

Figura 7.28.- (Tablas, T-29).- Intensidades de corriente para un MIPE sintetizado tras 3 minutos de $t(UV)$ e incubado en una concentración de 5×10^{-3} M en tolueno de las distintas especies interferentes estudiadas.....	206
Figura 7.29.- Voltamperograma diferencial de pulso obtenido con un electrodo de carbono vitrificado sin modificar en un medio de orina diluida 1:10 con citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10.....	210
Figura 7.30.- (Tablas, T-30).- Curva de adiciones estándar para un GCE en orina diluida 1:10 con citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10.....	211
Figura 7.31.- Voltamperograma diferencial de pulso para un electrodo de carbono vitrificado modificado con polímero molecularmente impreso (MIPE) sintetizado a un $t(UV)$ de un minuto tras una etapa de incubación en un medio de orina diluida 1:10 con citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10 con un 40% de acetonitrilo.....	212
Figura 7.32.- Voltamperograma diferencial de pulso obtenido en un medio de citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10.....	214

Lista de abreviaturas

Las abreviaturas utilizadas en este trabajo corresponden al símbolo o el acrónimo utilizado en la lengua inglesa, ya que es la forma en la que se suelen encontrar en las publicaciones científicas.

AIBN: α , α' -azoisobutironitrilo.

B: Analito enlazado.

CV: Voltamperometría Cíclica.

DA: Distribución de afinidad.

DFT: Teoría del Funcional de la Densidad.

Diglyme: Dietilenglicol dimetiléter.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DPP: 2, 2'-dimetoxi-2-fenilacetofenona.

DPV: Voltamperometría Diferencial de Pulso.

EGDMA: Etilenglicoldimetacrilato.

F: Analito libre.

HF: Hartree-Fock.

HVA: Ácido 2-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) acético o ácido homovanílico.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

GCE: Electrodo de carbono vitrificado

GTO: Funciones tipo Gaussiana.

IF: Isoterma de Freundlich.

IHVA: Ácido 2-(3-hidroxi-4-metoxi-fenil) acético o ácido isohomovanílico.

IAA: Ácido indolacético.

IL: Isoterma de Langmuir.

ILF: Isoterma de Langmuir-Freundlich.

IVMA: Ácido 3-hidroxi-4-metoxi-mandélico o ácido isovanillilmandélico.

K: Constante de afinidad o asociación.

LDA: Aproximación de la Densidad Local.

MA: 2-metacrilamida.

MAA: Ácido metacrílico.

MHPE: 4-hidroxi-3-metoxifeniletanol o alcohol homovanílico.

MIP: Polímero Molecularmente Impreso.

MIPE: Electrodo Modificado con Polímero Impreso.

N: Número de sitios de unión.

NIP: Polímero No Impreso.

NIPE: Electrodo Modificado con Polímero No Impreso.

PCM: Modelo del Continuo Polarizado.

PVAC: Polivinilacetato.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

SCF: Método del Campo Autoconsistente.

SRCF: Modelo del Campo de Reacción Autoconsistente.

STO: Funciones tipo Slater.

T: Analito total.

***t* (UV):** Tiempo que el electrodo de carbono vitrificado modificado con polímero está sometido a radiación UV antes de la rotación.

TFMAA: Ácido 2-trifluorometacrílico.

UV: Ultravioleta.

VMA: Ácido 2-hidroxi-2-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) acético o ácido vanillilmandélico.

VPY: 4-vinilpiridina.

Capítulo 1

Introducción

El diseño, preparación y caracterización de receptores sintéticos capaces de imitar los procesos de reconocimiento molecular por macromoléculas biológicas como enzimas, anticuerpos y bioreceptores naturales se ha establecido ya como uno de los grandes desafíos que marcarán las fronteras de la Química del siglo XXI. Esta área de investigación se engloba en la denominada por Breslow "Química biomimética" y es desde hace unos veinte años un área de investigación muy activa en la interfase entre la Química y la Biología^{1,2}. Este autor señala como objetivos del máximo interés la síntesis de receptores no proteicos con capacidad de reconocimiento molecular análoga a la de los anticuerpos y la creación de enzimas artificiales. Igualmente, indica su gran potencial de desarrollo en aplicaciones útiles para el análisis de compuestos biológicos de importancia clínica. Entre las metodologías de preparación de este tipo de estructuras biomiméticas, la impresión molecular o grabado molecular en polímeros está ya establecida como una de las alternativas más eficientes y flexibles³⁻¹¹.

Sin embargo, el desarrollo de aplicaciones analíticas está siendo más lento, debido a una serie de problemas relacionados con el empirismo que guía la síntesis de los polímeros, o las dificultades de conseguir el acoplamiento con diversos tipos de transductores. En este sentido, este trabajo pretende contribuir a superar estas dificultades.

1.1.- Principios generales de la impresión molecular

La impresión molecular es un proceso en el que los monómeros funcionales y el agente entrecruzante copolimerizan en presencia de la molécula impresora, que actúa como molécula molde¹²⁻¹⁴. Los monómeros funcionales inicialmente forman un complejo con la molécula impresora, y a medida que transcurre la polimerización, sus grupos funcionales se mantienen fijos adecuadamente orientados gracias a la matriz polimérica altamente entrecruzada. La posterior extracción de la molécula molde revela los sitios de reconocimiento que son complementarios en forma y tamaño a los del analito. Dicho de otra forma, se introduce una memoria molecular dentro del polímero. Se obtiene así una matriz tridimensional entrecruzada que proporciona la rigidez necesaria para mantener la morfología del polímero y, en definitiva, su capacidad para el reconocimiento de la molécula molde¹⁵⁻¹⁷.

El conjunto de fuerzas intermoleculares que actúan de forma específica sobre la superficie del polímero y la molécula molde contribuyen al reconocimiento molecular de manera similar a los receptores naturales y enzimas¹⁸⁻²⁸ con la ventaja añadida de mayor resistencia mecánica y química^{29,30}, y menor precio. Además, esta técnica permite fabricar un receptor artificial en casos en los que no exista un receptor natural.

Como consecuencia de la necesidad de rigidez estructural se ha empleado tradicionalmente como técnica de impresión molecular la síntesis de polímeros altamente entrecruzados, generalmente polímeros acrílicos mediante polimerización por radicales.

El proceso de impresión molecular con polímeros acrílicos se muestra en la siguiente figura:

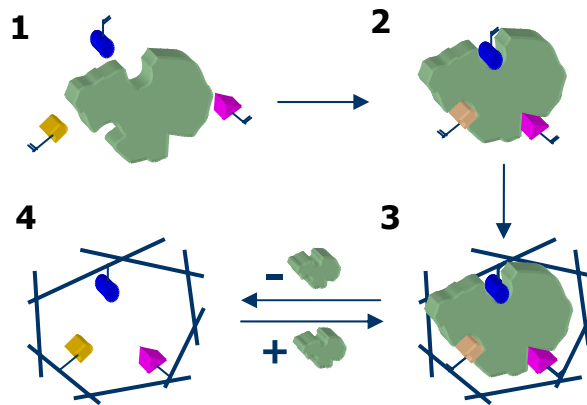


Figura 1.1.- Proceso de impresión molecular con polímeros acrílicos: 1) Mezcla de monómeros funcionales y molécula molde. 2) Formación del complejo monómero-molécula molde mediante interacciones covalentes o no covalentes. 3) Copolimerización del complejo con el agente entrecruzante, formando la matriz tridimensional rígida alrededor de la molécula impresora. 4) Extracción de la molécula molde revelando los sitios de reconocimiento. El reenlace de la molécula molde a dichos sitios de unión es reversible.

El complejo entre monómeros y molécula molde puede formarse a través de enlaces covalentes reversibles, mediante interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, o por una combinación de ambos tipos de interacciones. De esta forma, se distingue entre impresión molecular covalente, impresión molecular no covalente e impresión molecular mixta.

Introducción

En la impresión molecular covalente las interacciones entre los grupos funcionales de la molécula molde y el polímero son uniones covalentes fácilmente hidrolizables que dan lugar a sitios de unión homogéneos y definidos.

Las interacciones responsables del reenlace selectivo de la molécula impresora son también covalentes, lo que implica alta afinidad y selectividad hacia la molécula molde, pero bajas cinéticas de enlace. Esto limita el campo de aplicación de los polímeros, por ejemplo en el análisis cromatográfico donde son preferibles interacciones de cinética rápida que conduzcan a tiempos de análisis cortos.

En la impresión molecular no covalente las interacciones entre los grupos funcionales de la molécula impresora y los grupos funcionales del polímero son interacciones múltiples no covalentes, como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones de van der Waals, etc. Este tipo de impresión es mucho más flexible puesto que es posible escoger un mayor número de monómeros y moléculas impresoras. Sin embargo, mediante esta metodología se obtienen cavidades de unión más heterogéneas debido a los movimientos relativos entre molécula molde y polímero. Puesto que las interacciones responsables del reenlace de la molécula son interacciones débiles, proporcionan cinéticas de unión más favorables.

Por último, se presenta la impresión molecular mixta que combina las ventajas de las dos metodologías de impresión anteriores. La molécula se imprime como un complejo estable con los monómeros funcionales mediante interacciones covalentes mientras que el reenlace molécula molde-sitio de reconocimiento se produce a través de interacciones no covalentes.

A. Moléculas molde

Una de las características más importantes de la técnica de impresión molecular es que puede ser aplicada a un amplio número de moléculas, aunque actualmente su principal aplicación se centra en moléculas de bajo peso molecular y grupos funcionales discretos.

B. Matriz polimérica

La mayoría de las publicaciones sobre polímeros molecularmente impresos (MIPs) describen polímeros orgánicos sintetizados por polimerización radicalaria de monómeros funcionales y entrecruzador que poseen grupos vinilo o acilo y habitualmente interaccionan vía no covalente³¹. Los monómeros funcionales se suelen seleccionar teniendo en cuenta el carácter ácido o básico de la molécula molde³². Entre los más empleados se encuentran el ácido metacrílico y la vinilpiridina³³⁻³⁵. Normalmente, los monómeros tienen constantes de asociación con la molécula molde demasiado bajas para formar un complejo estable. Por esa razón se emplea un exceso de los mismos con el fin de desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo.

El proceso de polimerización se inicia disolviendo monómeros y molécula molde en un disolvente orgánico, denominado disolvente porogénico. La elección del disolvente porogénico utilizado en el proceso de impresión es determinante puesto que tanto la naturaleza del mismo como el volumen añadido a la mezcla de polimerización afecta al proceso de reconocimiento molecular. Se conoce, por ejemplo, que ciertos disolventes como el acetonitrilo generan mesoporos mientras que el cloroformo produce microporos; por lo tanto, afectará directamente a las propiedades de reconocimiento del polímero^{36, 37}. La selección del disolvente dependerá, en principio, del tipo de interacciones molécula

molde-monómero que predominen. Si predominan interacciones iónicas, será necesario un disolvente con baja constante dieléctrica, mientras que si predominan interacciones por puentes de hidrógeno será necesario un disolvente con poca actividad ácido-base. Sin embargo, estas reglas no son de carácter general, y la selección tanto de la naturaleza como del volumen adecuado de disolvente porogénico hasta la actualidad parecían condenados al empirismo.

La elección del entrecruzador ejerce influencia sobre el grado de hidrofobicidad y morfología del polímero impreso, afectando al diámetro y al volumen del poro. La cantidad de entrecruzador determina la rigidez del polímero resultante y por tanto la cinética de difusión de reenlace de la molécula molde a través de las cavidades. Debe existir un compromiso en la proporción del entrecruzador que se utiliza, puesto que un defecto del mismo conduciría a un polímero con una baja capacidad de reconocimiento y baja selectividad, mientras que un exceso de entrecruzador generaría un polímero muy rígido, carente de flexibilidad que podría impedir la accesibilidad de la molécula a los sitios de unión del polímero.

1.2.- Diseño racional de un elemento de reconocimiento para ácido homovanílico. Problemática.

La amplia variedad de monómeros funcionales disponibles hace posible el diseño de un MIP específico potencialmente para cualquier tipo de molécula. Sin embargo, actualmente, la selección del mejor monómero y el mejor disolvente porogénico para la impresión de una molécula molde determinada se realiza de forma totalmente empírica y por ello, dotar a este proceso de una base teórica constituye uno de los asuntos cruciales en la impresión molecular^{38, 39}.

Existen diversas alternativas metodológicas que intentan dar solución a este problema, como son la química combinatoria⁴⁰⁻⁴⁴, la quimiometría⁴⁵⁻⁴⁷ o aproximaciones computacionales como la mecánica molecular⁴⁸⁻⁵⁷. La química combinatoria y la quimiometría no son realmente herramientas predictivas sino métodos que permiten optimizar las variables del proceso de impresión molecular. En los dos casos es necesario sintetizar gran número de polímeros en distintas condiciones y comprobar experimentalmente sus propiedades de enlace, hecho que supone un importante consumo de tiempo y recursos. La química teórica computacional basada en la mecánica molecular, constituye una importante herramienta de predicción, aunque con importantes hipótesis simplificadoras.

Por esta razón, el presente trabajo está enfocado en la descripción de un método alternativo para el diseño de MIPs, basado en cálculos *ab-initio*. La idea es crear una librería virtual de monómeros funcionales y evaluar su interacción con la molécula molde en diferentes disolventes.

En esta Tesis Doctoral se empleó la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) para calcular las energías de interacción de la molécula de interés y de los monómeros funcionales: ácido 2-trifluorometacrílico (TFMAA), ácido metacrílico (MAA), 2-metacrilamida (MA) y 4-vinilpiridina (VPY) en seis disolventes que barren un amplio espectro de constantes dieléctricas (tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo, agua y dimetilsulfóxido). El trabajo se centró en la impresión molecular no covalente.

Se abordó inicialmente el estudio de complejos 1:1 (una molécula molde interaccionando con una molécula de monómero), pasando después al análisis de complejos 1:2 (una molécula molde rodeada de dos monómeros). Se realizó a continuación una primera aproximación a la caracterización DFT de la selectividad del MIP mediante el cálculo de la

energía de estabilización de distintos complejos formados entre el monómero más favorable y varias moléculas análogas a la molde.

Para cada monómero estudiado se realizó una búsqueda conformacional para localizar las estructuras más estables del complejo monómero-molécula molde, prestando especial atención al mínimo de energía global que fue utilizado para comparar la energía de estabilización de los distintos monómeros con la molécula molde.

Se pretendió también comprobar la validez de los cálculos DFT realizados sintetizando un polímero molecularmente impreso (MIP) con la selección óptima de monómero funcional y disolvente arrojada por las predicciones teóricas. El MIP sintetizado se caracterizó a partir de ensayos de unión, evaluando sus propiedades de enlace a través de la aplicación de distintas isothermas de adsorción.

1.3.- Selección de la molécula molde

La molécula inicialmente escogida para sintetizar el MIP fue el ácido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético o HVA). La estructura del mismo se muestra en la figura 1.2.

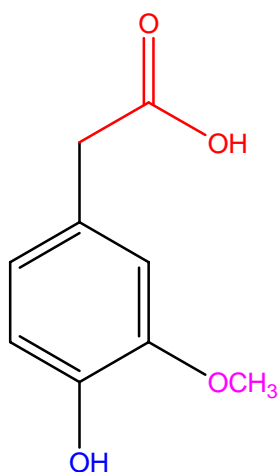


Figura 1.2.- Estructura molecular del ácido homovanílico.

La selección del HVA como molécula molde para llevar a cabo la impresión molecular se realizó atendiendo a varias razones:

Por un lado, se trata de una molécula de bajo peso molecular, con grupos funcionales discretos capaces de formar puentes de hidrógeno con los monómeros funcionales. Estas propiedades facilitan tanto la difusión a través de los poros del polímero como la modelización, permitiendo realizar esta última a un coste computacional relativamente bajo.

Por otro lado, el análisis del HVA tiene gran relevancia clínica debido a que se emplea como marcador diagnóstico de tumores. Constituye el metabolito urinario mayoritario de la dopamina y su excreción por encima de niveles normales indica la presencia de trastornos neurológicos que se relacionan con tumores de la cresta neural como feocromocitoma y neuroblastoma⁵⁸⁻⁶⁹ además de desórdenes esquizoafectivos⁷⁰⁻⁷⁴.

Análíticamente el control de este metabolito se lleva a cabo normalmente mediante HPLC⁷⁵⁻⁸², con diferentes tipos de detección. También se han desarrollado métodos basados en inmunoensayos^{83, 84}, cromatografía de gases⁸⁵⁻⁹⁰ y electroforesis capilar⁹¹⁻⁹⁶.

El propósito de este trabajo es emplear la metodología DFT para seleccionar el mejor monómero funcional y disolvente porogénico para llevar a cabo la impresión molecular, y aplicar esta selección previa a la síntesis de un polímero molecularmente impreso para ácido homovanílico.

Se estudiará también su integración con un transductor voltamétrico con el fin de desarrollar un sensor. Este tipo de dispositivos ofrece ventajas como una alta sensibilidad, bajo coste y fácil automatización y miniaturización, lo que hace que sea factible su comercialización. Sin embargo, el desarrollo de este tipo de sensores utilizando como elemento de reconocimiento un polímero impreso ha estado frenado hasta la fecha por las dificultades en su acoplamiento con un transductor voltamétrico.

Capítulo 2

Objetivos

El objetivo general de este trabajo consiste en sentar la metodología *ab initio* necesaria para realizar una selección de monómero y disolvente óptimo y aplicar esta selección previa a la síntesis de polímeros molecularmente impresos (MIPs). Para ello, se estudian las energías de interacción entre los monómeros funcionales y la molécula molde, ácido homovanílico (HVA), integrando en el cálculo los efectos del disolvente porogénico.

La hipótesis de partida consiste en que la combinación del monómero y disolvente que lleve a un aducto con mayor energía de estabilización, conducirá al polímero con mayor afinidad por la molécula molde. Esta hipótesis ha de ser validada experimentalmente.

Los objetivos específicos de este trabajo son por tanto:

Objetivos

1. Utilizar el método del Funcional de la Densidad (DFT) para calcular la energía de estabilización del aducto formado por la molécula molde (ácido homovanílico) y varios monómeros funcionales disponibles comercialmente.
2. Incorporar el efecto del disolvente en esa energía de estabilización aplicando el Modelo del Continuo Polarizado.
3. Con la selección de monómero y disolvente óptimo predicha por el método computacional, sintetizar polímeros impresos para ácido homovanílico, y evaluar sus propiedades de reconocimiento mediante parámetros como son la constante de afinidad y el número de sitios de unión. Con este fin, se cuantificará la fracción libre y enlazada de analito mediante un método voltamétrico de análisis, y se aplicarán a estos datos diversos tratamientos matemáticos (isotermas de Langmuir, Freundlich, y Langmuir-Freundlich).
4. Investigar el acoplamiento del polímero molecularmente impreso con un transductor voltamétrico en el diseño de un sensor para ácido homovanílico (HVA). Con tal finalidad, se realizará la síntesis de capas finas de polímero directamente sobre un electrodo de carbono vitrificado mediante la técnica de recubrimiento bajo rotación (*spin coating*) y polimerización fotoquímica.
5. Caracterizar la fase sensora polimérica, en términos de grosor de la película obtenida y su permeabilidad, empleando microscopía óptica y técnicas electroanalíticas.

6. Evaluar las propiedades de reconocimiento molecular del sensor preparado con los monómeros y disolventes óptimos previstos por el método de diseño computacional, y comprobar la validez de la hipótesis de partida.

7. Estudiar las posibilidades de desarrollar un método analítico para la determinación de HVA en muestras de orina, empleando el sensor construido.

Capítulo 3

Métodos de cálculo

3.1.- Métodos *ab-initio*

En este apartado se presentan los aspectos fundamentales de la metodología *ab-initio*⁹⁷. Todos los sistemas moleculares estudiados tienen una estructura electrónica de capa cerrada, por este motivo en la exposición nos limitaremos a este tipo de sistemas.

3.1.1.- Método SCF

Para estudiar los estados estacionarios de una molécula es necesario resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. Si no se consideran los efectos relativistas y dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer, el cálculo de la energía electrónica para cada configuración nuclear requiere solucionar la ecuación electrónica de valores propios:

$$H\Psi = E\Psi \quad [3.1]$$

Donde Ψ depende de las coordenadas de los electrones e incluye como parámetros las coordenadas de los núcleos, E es la energía electrónica o superficie de energía potencial del sistema y H es el Hamiltoniano electrónico:

$$H = \sum_{i=1}^{2N} \left(-\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^{nuc} \frac{Z_A}{r_{iA}} \right) + \sum_{i=1}^{2N-1} \sum_{j>i}^{2N} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^{nuc-1} \sum_{B>A}^{nuc} \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} \quad [3.2]$$

Donde:

$2N$ es el número de electrones del sistema, nuc el número de núcleos del sistema, ∇_i^2 es el operador "nabla cuadrado", r_{iA} la distancia entre el electrón i y el núcleo A , r_{ij} la distancia entre los electrones i y j , r_{AB} la distancia entre los núcleos A y B y Z_A y Z_B las cargas nucleares de los núcleos A y B .

Esta ecuación no puede resolverse exactamente para sistemas con dos o más electrones por lo que es necesario hacer nuevas aproximaciones. En el método Hartree-Fock o del Campo Autoconsistente (SCF), se considera que cada electrón se mueve en un potencial efectivo creado por los núcleos y el resto de los electrones. Esta simplificación conduce a un conjunto de ecuaciones monoeléctricas que son resolubles para sistemas atómicos.

Para un sistema con $2N$ electrones de capa cerrada la función de onda puede escribirse como un determinante de Slater:

$$\psi(1,2,\dots,2N) = (2N!)^{-1/2} |\varphi_1(1)\alpha(1)\varphi_1(2)\beta(2)\dots\varphi_N(2N)\beta(2N)| \quad [3.3]$$

Donde ϕ_i son los orbitales moleculares espaciales ortonormales y α y β las funciones de espín.

La energía del sistema viene dada por la expresión:

$$E = \langle \Psi | H | \Psi \rangle = 2 \sum_{i=1}^N (\phi_i | \hat{h} | \phi_i) + \sum_i^N \sum_j^N (2J_{ij} - K_{ij}) \quad [3.4]$$

Donde:

$$(\phi_i | \hat{h} | \phi_i) = h_{ii} = \langle \phi_i(1) | -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_A Z_A r_{iA}^{-1} | \phi_i(1) \rangle \quad [3.5]$$

$$J_{ij} = \langle \phi_i(1) \phi_j(2) | r_{12}^{-1} | \phi_i(1) \phi_j(2) \rangle \quad [3.6]$$

$$K_{ij} = \langle \phi_i(1) \phi_j(2) | r_{12}^{-1} | \phi_j(1) \phi_i(2) \rangle \quad [3.7]$$

Y todos los sumatorios se extienden hasta el número de electrones totales.

El principio variacional asegura que la mejor función de onda con la forma funcional [3.3] es la que minimiza la energía. Así pues, para obtener los orbitales moleculares óptimos se minimiza la expresión [3.4] con la restricción de que los orbitales moleculares sean ortonormales. De esta forma se obtiene un sistema de N ecuaciones monoelectrónicas integrodiferenciales que se denominan ecuaciones de Hartree-Fock:

$$\mathbf{F} \phi_i = \varepsilon_i \phi_i \quad [3.8]$$

$$i=1, \dots, N$$

$$\text{Siendo } F = H_{core} + \sum_j (2J_j - K_j) \quad [3.9]$$

donde:

$$H_{core} = -\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_A Z_A r_{iA}^{-1} \quad [3.10]$$

$$J_j(1) \phi_i(1) = \int \phi_j(2) r_{12}^{-1} \phi_j(2) d\tau_2 \int \phi_i(1) \quad [3.11]$$

$$K_j(1) \phi_i(1) = \int \phi_j^*(2) r_{12}^{-1} \phi_i(2) d\tau_2 \int \phi_j(1) \quad [3.12]$$

La solución de las ecuaciones Hartree-Fock [3.8] suministra los orbitales SCF o Hartree-Fock y sus correspondientes energías orbitales ε_i . Para resolver las ecuaciones Hartree-Fock en sistemas de dos o más núcleos es necesario introducir una nueva aproximación. Roothaan⁹⁸ demostró que el desarrollo de los orbitales en términos de una base de funciones conocidas convertía las ecuaciones integrodiferenciales de Hartree-Fock en ecuaciones algebraicas resolubles por técnicas matriciales. Así pues, si se escoge un conjunto de base formado por k funciones denominadas χ_s con $s=1, \dots, k$, $k \geq N$, podremos expresar los orbitales ϕ_i como combinación lineal de las mismas:

$$\phi_i = \sum_{s=1}^k c_{si} \chi_s \quad [3.13]$$

Si se sustituyen estas expresiones [3.13] para los ϕ_i en la expresión de la energía [3.8] y se minimiza ésta con respecto a los coeficientes c_{si} se obtienen las ecuaciones de Hartree-Fock-Roothaan:

$$\sum_s (F_{rs} - \varepsilon_i S_{rs}) c_{si} = 0 \quad [3.14]$$

Donde:

S_{rs} es un elemento de la matriz de solapamiento $S_{rs} = \langle \chi_r(1) | \chi_s(1) \rangle$

ε_i es la energía correspondiente al orbital ϕ_i

y F_{rs} es un elemento de la matriz de Fock:

$$F_{rs} = H_{rs} + \sum_p \sum_q P_{pq} (\langle rp|sq \rangle) - \frac{1}{2} (\langle rp|qs \rangle) \quad [3.15]$$

Donde:

$$H_{rs} = \left\langle \chi_r(\mathbf{I}) \left| -\frac{1}{2} \nabla_i^2 \right| \chi_s(\mathbf{I}) \right\rangle + \sum_A^{nuc} \left\langle \chi_r(\mathbf{I}) \left| -\frac{Z_A}{r_{12}} \right| \chi_s(\mathbf{I}) \right\rangle \quad [3.16]$$

$\langle rp|sq \rangle$ la integral bielectrónica:

$$\langle rp|sq \rangle = \left\langle \chi_r(\mathbf{I}) \chi_p(\mathbf{2}) \left| r_{12}^{-1} \right| \chi_s(\mathbf{I}) \chi_q(\mathbf{2}) \right\rangle \quad [3.17]$$

Y P_{pq} un elemento de la matriz densidad monoeléctronica dado por:

$$P_{pq} = 2 \sum_i c_{pi}^* c_{qi} \quad [3.18]$$

Las ecuaciones [3.14] en su conjunto constituyen un problema matricial de pseudovalores propios que debe solucionarse iterativamente ya que los elementos de la matriz densidad P_{pq} dependen de los coeficientes C_{si} solución del problema. El proceso de iteración se repite hasta que se alcance la convergencia.

3.1.2.- Funciones de base

Si el desarrollo de las ecuaciones [3.13] se realizara en términos de un conjunto completo de funciones apropiadas, podríamos expresar los orbitales moleculares Hartree-Fock de un modo exacto. En la práctica, sin embargo, se debe trabajar con un conjunto finito, relativamente pequeño, de funciones que permitan llevar a cabo el cálculo con los medios de que se dispone.

Evidentemente, la calidad y significado de un cálculo *ab initio* va a depender drásticamente del tipo de funciones que constituyan dicho conjunto y del número de las mismas.

Los tipos de funciones que se suelen tomar como base son: funciones tipo Slater (STO) y funciones tipo Gaussiana (GTO). En los cálculos moleculares se emplean masivamente las GTO cartesianas que se definen como:

$$\chi_{slmn}(x, y, z) = N(l, \alpha_s) N(m, \alpha_s) N(n, \alpha_s) x^l y^m z^n e^{-\alpha_s r^2} \quad [3.19]$$

Donde:

$$N(k, \alpha) = [(2k - 1)!!]^{-1/2} \left(\frac{2^{4k+1}}{\pi} \right)^{1/4} \alpha^{\frac{2k+1}{4}} \quad k=l, m, n \quad [3.20]$$

Dependiendo del valor que tome la suma $l+m+n$ en [3.19] podemos hablar de GTO cartesianas tipo *s*, *p*, *d*...

Pople y colaboradores⁹⁹ han construido diversos tipos de funciones de base GTO que son muy utilizadas y que se incluyen como opciones estándar en los programas de cálculo desarrollados por dicho grupo. En este trabajo se empleó la base 6-31G* para la localización y caracterización de los distintos complejos. En ella, los orbitales de core están representados por una función de base contraída formada por seis primitivas y los orbitales de valencia vienen dados por una función de base contraída formada por tres primitivas y otra formada por sólo una gaussiana primitiva. El asterisco significa que la base cuenta, además, con funciones de polarización de tipo *d* para los elementos del segundo período.

Posteriormente se han obtenido mejores valores para las energías de estabilización haciendo un recálculo con la base 6-311+G** sobre las geometrías optimizadas con la base 6-31G*.

La elección de una base para realizar determinado trabajo debe realizarse con sumo cuidado, puesto que de ella dependen el significado y la precisión de los resultados.

3.1.3.- Energía de correlación

La aproximación de Hartree-Fock, también llamada de partículas independientes, presenta problemas por no dar cuenta satisfactoriamente de las interacciones de los electrones. Sólo para electrones con espín paralelo esta aproximación da probabilidad cero de que se encuentren en el mismo punto del espacio.

La energía de correlación viene definida como la diferencia entre la energía no relativista exacta del sistema (E) y la energía de Hartree-Fock (E_0).

$$E_{corr} = E - E_0 \quad [3.21]$$

3.2.- Teoría del funcional de la densidad (DFT)

Los métodos *ab initio* post-Hartree-Fock (interacción de configuraciones, Möller-Plesser, clúster acoplado) permiten evaluar la energía de correlación electrónica en una base de funciones de N partículas que son los determinantes de Slater. Los métodos del funcional de la densidad también permiten calcular la energía de un sistema incluyendo la correlación electrónica, pero mediante un procedimiento alternativo.

La base de la teoría del funcional de la densidad es el teorema de Hohenberg-Kohn, que afirma que la energía del estado electrónico fundamental de un sistema puede determinarse si se conoce su densidad electrónica $\rho(r)$. Es decir, la energía es un funcional de la densidad y se expresa de la siguiente forma:

$$E(\rho) = T(\rho) + E_{en}(\rho) + E_{ee}(\rho) \quad [3.22]$$

Donde $T(\rho)$ representa la energía cinética, $E_{en}(\rho)$ la energía de interacción electrón-núcleo y $E_{ee}(\rho)$ la interacción electrón-electrón. Ésta última puede subdividirse a su vez en dos términos:

$$E_{en}(\rho) = J(\rho) + K(\rho) \quad [3.23]$$

Donde $J(\rho)$ recoge la interacción de Coulomb y $K(\rho)$ la de intercambio.

El principal problema de la teoría es que no dice cuál es la forma exacta del funcional o cómo construirlo. El paso que permite aplicar este formalismo a la Química Cuántica fue dado por Kohn y Sham¹⁰⁰ al considerar un sistema de N electrones sin interaccionar descrito por unos orbitales ϕ_i de forma que la densidad electrónica de este sistema modelo, $\rho_s(r)$, coincida con la del sistema real, $\rho(r)$, en el que sí hay interacciones.

De este modo, la expresión general para la energía DFT es:

$$E_{DFT} = T_s(\rho) + E_{en}(\rho) + J(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad [3.24]$$

Donde $T_s(\rho)$ es una aproximación a la energía cinética real $T(\rho)$, ya que corresponde a la de un sistema de N electrones sin interaccionar y $E_{xc}(\rho)$ es el denominado término de correlación e intercambio:

$$E_{xc}(\rho) = [T(\rho) - T_s(\rho)] + [E_{ee}(\rho) - J(\rho)] \quad [3.25]$$

Este término engloba el resto de la energía cinética que no se tiene en cuenta en $T_s(\rho)$ por asumir un sistema de partículas independientes, además de la energía de interacción no clásica electrón-electrón.

La aplicación del principio variacional a la expresión de la energía DFT, E_{DFT} , permite asegurar que la mejor densidad electrónica será aquella que minimice $E_{DFT}(\rho)$ con la restricción de que:

$$\int \rho(r) dr = N \quad [3.26]$$

Siendo N el número de electrones que contiene el sistema molecular. El proceso de minimización conduce a las denominadas ecuaciones de Kohn-Sham:

$$F_{KS} \phi_i = \varepsilon_i \phi_i \quad [3.27]$$

Que forman un conjunto de ecuaciones cuyos vectores propios son los orbitales de Kohn-Sham y en la que el operador F_{KS} es:

$$F_{KS} = -\frac{1}{2} \nabla^2 + V_{efec} \quad [3.28]$$

Siendo V_{efec} un potencial efectivo que incluye el potencial de interacción electrón-núcleo, el de repulsión electrón-electrón clásico y el potencial de correlación-intercambio:

$$V_{efec}(\mathbf{r}) = V_{en}(\mathbf{r}) + J(\mathbf{r}) + V_{xc}(\mathbf{r}) \quad [3.29]$$

$$V_{xc} = \frac{\partial E_{xc}}{\partial \rho(\mathbf{r})} \quad [3.30]$$

Si se lograra conocer E_{xc} de manera exacta, la teoría del funcional de la densidad proporcionaría la energía total exacta, incluyendo la energía de correlación.

Se puede demostrar que el potencial de intercambio-correlación es un funcional único, de validez general. Sin embargo, su forma explícita no se conoce. La diferencia entre los distintos métodos DFT está precisamente en la elección de dicha forma funcional.

Se han desarrollado distintos tipos de funcionales que pueden agruparse en tres grandes tipos según las aproximaciones que se realizan para estimar E_{xc} : los basados en la aproximación de la densidad local (LDA), los que se basan en la aproximación del gradiente generalizado y los funcionales híbridos.

En general, es costumbre separar el funcional de intercambio-correlación en dos contribuciones para facilitar su construcción, una que incluye el intercambio, $E_x(\rho)$, y otra que incluye la correlación, $E_c(\rho)$.

En la aproximación de la densidad local (LDA) se considera que el funcional en el punto \bar{r} depende sólo de la densidad en dicho punto, aunque en realidad el funcional es no local y depende de ρ en todo el espacio. En esta aproximación el funcional depende de la densidad, tratada como la de un gas uniforme de electrones.

La energía de intercambio de un gas uniforme de electrones viene dada por la fórmula de Dirac:

$$E_x^{LDA}(\rho) = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{1/3} \int \rho^{4/3}(r) dr \quad [3.31]$$

Vosko, Wilk y Nusair (VWN)¹⁰¹ han obtenido una expresión para la energía de correlación $E_c(\rho)$ para un gas uniforme de electrones basándose en cálculos Monte Carlo (E_c^{LDA}).

En la aproximación del gradiente generalizado se modeliza la densidad electrónica de una molécula como un gas de electrones no uniforme. Matemáticamente esto significa que tanto E_x como E_c dependen no sólo de la densidad electrónica $\rho(r)$, sino también de sus derivadas. Becke¹⁰² propuso una corrección (B88) para la energía de intercambio LDA que se utiliza frecuentemente en los cálculos DFT. Entre las formas funcionales diseñadas en esta aproximación para dar cuenta de la energía de correlación una de las más populares es la de Lee, Yang y Parr (LYP)¹⁰³.

Otro tipo de funcionales, denominados híbridos, son aquellos que incorporan parte de la energía de intercambio exacta de Hartee-Fock en el funcional de intercambio. De entre esos funcionales, el más utilizado es el propuesto por Becke en 1993 (B3). La combinación del funcional de intercambio B3 con el funcional de correlación LYP conduce al funcional B3LYP, que es el utilizado en el presente trabajo:

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1-a)E_x^{exacta} + (a-b)E_x^{LDA} + bE_x^{B88} + cE_c^{LYP} + (1-c)E_c^{VWN} \quad [3.32]$$

Los valores de los coeficientes a , b y c se determinan realizando un ajuste a un conjunto de propiedades termodinámicas.

3.3.- Termodinámica estadística

El paso de las propiedades moleculares a las macroscópicas y observables es posible gracias a la Termodinámica Estadística. En la presente Tesis de Doctoral se adoptan los modelos de gas ideal, rotor rígido y oscilador armónico para obtener expresiones termodinámico-estadísticas para la entalpía, entropía y energía de Gibbs en fase gas¹⁰⁴. Igualmente, se supone la presión igual a una atmósfera y la temperatura igual a 298,16 K.

3.4.- El efecto del disolvente

Es bien sabido que el disolvente modifica las propiedades moleculares de las moléculas disueltas e influye en su reactividad. Una molécula polar de soluto sumergida en un disolvente polar provoca la orientación de las moléculas de disolvente en torno a ella y hace aumentar el momento dipolar de dichas moléculas. A su vez, el disolvente polarizado genera un campo eléctrico en torno a cada molécula de soluto, el llamado campo de reacción.

El método mecanocuántico más común para calcular los efectos del disolvente sobre las propiedades moleculares y la reactividad química se basa en un modelo continuo del disolvente en el que se ignora su estructura molecular y se le trata como un dieléctrico continuo de dimensiones infinitas caracterizado por su constante dieléctrica. En el tratamiento mecanocuántico, la interacción entre una molécula de soluto y el continuo dieléctrico que la rodea se modeliza mediante un término V_{int} que se añade al Hamiltoniano electrónico molecular. En este modelo se permite que cambie la función de onda electrónica de la molécula de soluto al pasar de la fase gaseosa a la disolución, de forma que se alcance la autoconsistencia entre la distribución de carga del soluto y el campo de reacción del disolvente.

Un tratamiento en el que se alcance la autoconsistencia se denomina modelo del campo de reacción autoconsistente (abreviado con el acrónimo en inglés SCRF). Existen diversos métodos para evaluar el efecto del disolvente que se encuadran en el marco SCRF y que difieren en la forma de la cavidad creada en el disolvente para albergar al soluto, y en el modo de evaluar la energía potencial de interacción entre la distribución de carga molecular y el dieléctrico continuo. En este trabajo se utiliza el modelo PCM (del inglés Polarizable Continuum Model). El modelo que

sustenta este método considera una cavidad en el disolvente con forma compleja obtenida asignando a cada núcleo atómico una esfera de radio 1.2 veces el radio de Van del Waals del átomo.

El volumen de la cavidad es el ocupado por estas esferas atómicas solapadas. Además, la energía potencial de interacción soluto-disolvente se aproxima como una serie infinita, la llamada expansión multipolar, en la que van apareciendo en términos sucesivos el momento dipolar de la molécula de soluto, su momento cuadrupolar, etc. La forma compleja de la cavidad hace que no se puedan obtener expresiones analíticas para los coeficientes de esta expansión multipolar y que tengan que ser calculados mediante un método numérico iterativo.

3.5.- Nivel de cálculo utilizado y energías de estabilización

Todos los cálculos desarrollados a lo largo de este trabajo se realizaron con el software Gaussian 98¹⁰⁵ en una plataforma SGI Origin 3800 operando en el sistema operativo IRIX 6.5.23f, proporcionado gratuitamente por el servicio de supercomputación del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT).

En distintos puntos de los apartados anteriores queda dicho que el nivel de cálculo utilizado en este trabajo para la localización y caracterización de los distintos complejos es B3LYP/6-31G*. Posteriormente, aceptando la hipótesis de que las geometrías de los complejos apenas varían con el cambio de base, se efectúa un cálculo puntual con la base de mayor tamaño 6-311+G** sobre las geometrías anteriormente optimizadas, puesto que un aumento en la flexibilidad del conjunto de funciones de base redundaría en una disminución de la energía

absoluta, es decir, según el principio variacional, en un mayor acercamiento al valor exacto de la energía.

Las energías de estabilización de los distintos complejos se han evaluado como la diferencia entre la energía absoluta del complejo y la suma de las energías absolutas de las moléculas que lo componen.

Capítulo 4

Desarrollo de un método computacional para el diseño de un polímero impreso para ácido homovanílico

4.1.- Antecedentes

Cálculos DFT en el diseño racional de polímeros impresos

Hasta la fecha, la evaluación de la afinidad del MIP, que supone llevar a cabo la síntesis completa del polímero para distintos monómeros funcionales y disolventes porogénicos, viene realizándose por el método de prueba y error, utilizando una selección previa de componentes basada en la mera intuición química.

Con el fin de simplificar la optimización de los MIPs, Sellergren y colaboradores¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ propusieron una metodología de síntesis de alto rendimiento a escala reducida (mini-MIPs) que utiliza dispositivos robotizados capaces de sintetizar y evaluar mediante ensayos de unión un

gran número de polímeros sintetizados en pequeña escala con composiciones variables de monómero funcional, entrecruzantes y disolventes porogénicos, dirigidos por procedimientos combinatorios. Esta metodología no constituye una herramienta predictiva en sí, y desde el punto de vista experimental, tampoco contribuye realmente a simplificar las etapas de optimización del polímero.

Por otro lado, se han desarrollado en los últimos años estrategias de diseño racional basadas en la evaluación de las energías de interacción entre la molécula molde y los monómeros funcionales que intervienen en la formación de un aducto por medio de enlaces no covalentes. Estos métodos computacionales se basan en lo que se denomina "el paradigma de la tecnología de impresión molecular": el éxito del proceso de impresión recae en la estabilidad del complejo de prepolimerización¹⁰⁹. Mosbach y colaboradores demostraron mediante medidas de RMN que efectivamente se formaba un aducto de prepolimerización, y mediante valoración de la molécula molde (fenilalanina) con uno de los monómeros funcionales (ácido metacrílico), era posible determinar la relación óptima entre ambos para formar la unidad macromolecular más estable. Este procedimiento ha seguido utilizándose para identificar la naturaleza de la interacción origen de la impresión no covalente, buscando desarrollar herramientas predictivas para el diseño de MIPs^{110, 111}.

Las estrategias seguidas se basan en el cálculo de la energía de estabilización en la formación de dicho aducto como diferencia de la energía de formación del aducto y la energía de monómeros y molécula molde por separado:

$$\Delta E_{\text{estabilización}} = \Delta E_{\text{aducto}} - [\Delta E_{\text{monómeros}} + \Delta E_{\text{molécula molde}}]$$

Para el cálculo de dicha energía, el método que se ha extendido más en los últimos años ha sido la utilización de un *software* de modelización molecular para estudiar la conformación del aducto monómero-molécula huésped antes de la polimerización¹¹². El grupo de Piletsky, en la universidad de Cranfield (UK) ha conseguido mejoras en la selectividad de los MIPs mediante este tipo de simulación computacional⁴⁸⁻⁵⁵, y ha sido el responsable de su uso extendido. Estos resultados derivan de la aplicación de métodos de mecánica molecular y pueden superarse mediante la aplicación de métodos de mecánica cuántica. De estos, los semiempíricos^{113, 114} se prefieren en ocasiones, ya que requieren un menor coste computacional. Pero una descripción más exacta del sistema se consigue mediante los métodos *ab initio*, y del funcional de la densidad (DFT).

Sin embargo, en la bibliografía sólo se han publicado recientemente dos antecedentes de cálculos *ab-initio* aplicados a la impresión molecular. El trabajo de Mukawa y colaboradores¹¹⁵ es un ejemplo de impresión molecular covalente con alilfenildisulfuro como molécula molde, que emplea como monómero funcional divinilbenceno. La ruptura del puente disulfuro se realizó mediante reducción con borohidruro de sodio dejando un grupo tiol en los sitios de unión. El proceso no resultó totalmente satisfactorio, puesto que después de comprobar la selectividad con diferentes moléculas, se observaron mayores factores de retención para una molécula huésped distinta a la molécula molde. Además, sólo se realizó un estudio de los complejos 1:1, sin evaluar el efecto del entrecruzador ni el efecto del disolvente, puesto que los cálculos se limitaron a la fase gaseosa.

El otro trabajo descrito que emplea la metodología *ab initio*¹¹⁶ estudia la interacción 1-1 y 1-2 entre dos posibles monómeros funcionales, ácido metacrílico (MAA) y 2-metacrilamida (MA), y diferentes moléculas molde con el fin de seleccionar el sistema que conduzca a una mayor estabilización del complejo. Se aplicaron dos métodos de cálculo: PM3 que es un método semiempírico, y un método *ab initio* (HF) con la base 6-31G. Los resultados obtenidos se comprobaron mediante cromatografía líquida obteniendo una buena correlación para los dos métodos. Sin embargo, el estudio se limitó a la fase gaseosa, no incluyendo ni el efecto del entrecruzador ni el efecto del disolvente porogénico, crucial en el proceso de impresión molecular.

Se puede decir por lo tanto, que el estudio realizado en esta Tesis es pionero en este campo, en el sentido de que en el cálculo se incluyen bases de mayor tamaño destinadas a obtener mejores energías, 6-31G* para la optimización de los complejos y 6-311+G** para los cálculos puntuales, incluyéndose además el efecto del disolvente mediante el Modelo del Continuo Polarizado (PCM).

Parte de los resultados que se presentan en este capítulo han sido publicados en la revista *Analytical Chemistry* en el año 2005¹¹⁷, constituyendo en este momento el método más riguroso en el cálculo de la energía del aducto de prepolimerización, y la forma más exacta de fundamentar predicciones teóricas. Esta metodología ha sido adoptada en estudios posteriores, aunque de forma incompleta, sin incluir el efecto del disolvente¹¹⁸ o empleando un nivel de cálculo menos exigente¹¹⁹⁻¹²².

4.2.- Desarrollo del método computacional. Selección del mejor monómero funcional y del mejor disolvente

Los monómeros funcionales escogidos para realizar la evaluación computacional de la energía del aducto de prepolimerización son: ácido 2-trifluorometacrílico (TFMAA), ácido metacrílico (MAA), 2-metacrilamida (MA) y 4-vinilpiridina (VPY), y los disolventes: tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo, agua y dimetilsulfóxido.

4.2.1.- Geometría y energía electrónica de la molécula molde (HVA)

Mediante cálculos DFT al nivel B3LYP/6-31G* se obtiene la geometría del isómero más estable de la molécula molde (figura 4.1).



Figura 4.1.- Geometría optimizada del HVA.

En la impresión molecular no covalente se asume la hipótesis de que una de las interacciones más fuertes entre la molécula molde y el monómero funcional es la que tiene lugar a través de puentes de hidrógeno, por lo que lo más significativo de la molécula de HVA es la presencia de un grupo ácido carboxílico, un grupo hidroxilo y un grupo

metóxido, es decir, tres grupos funcionales disponibles para formar puentes de hidrógeno con los monómeros funcionales.

La geometría optimizada de la figura 4.1 muestra que en el isómero más estable del HVA existe un puente de hidrógeno intramolecular entre el hidrógeno del grupo hidroxilo y el oxígeno del grupo metóxido. Energéticamente este puente de hidrógeno supone una estabilización de unas 5 kcal/mol respecto a otros isómeros del HVA en los que el hidrógeno hidroxílico está hacia el lado opuesto del grupo metóxido. La energía absoluta para la molécula de HVA es de -650.0744 unidades atómicas al nivel de cálculo utilizado para evaluar las energías (B3LYP/6-311+G**//B3LYP/6-31G*).

4.2.2.- Interacción HVA-TFMAA

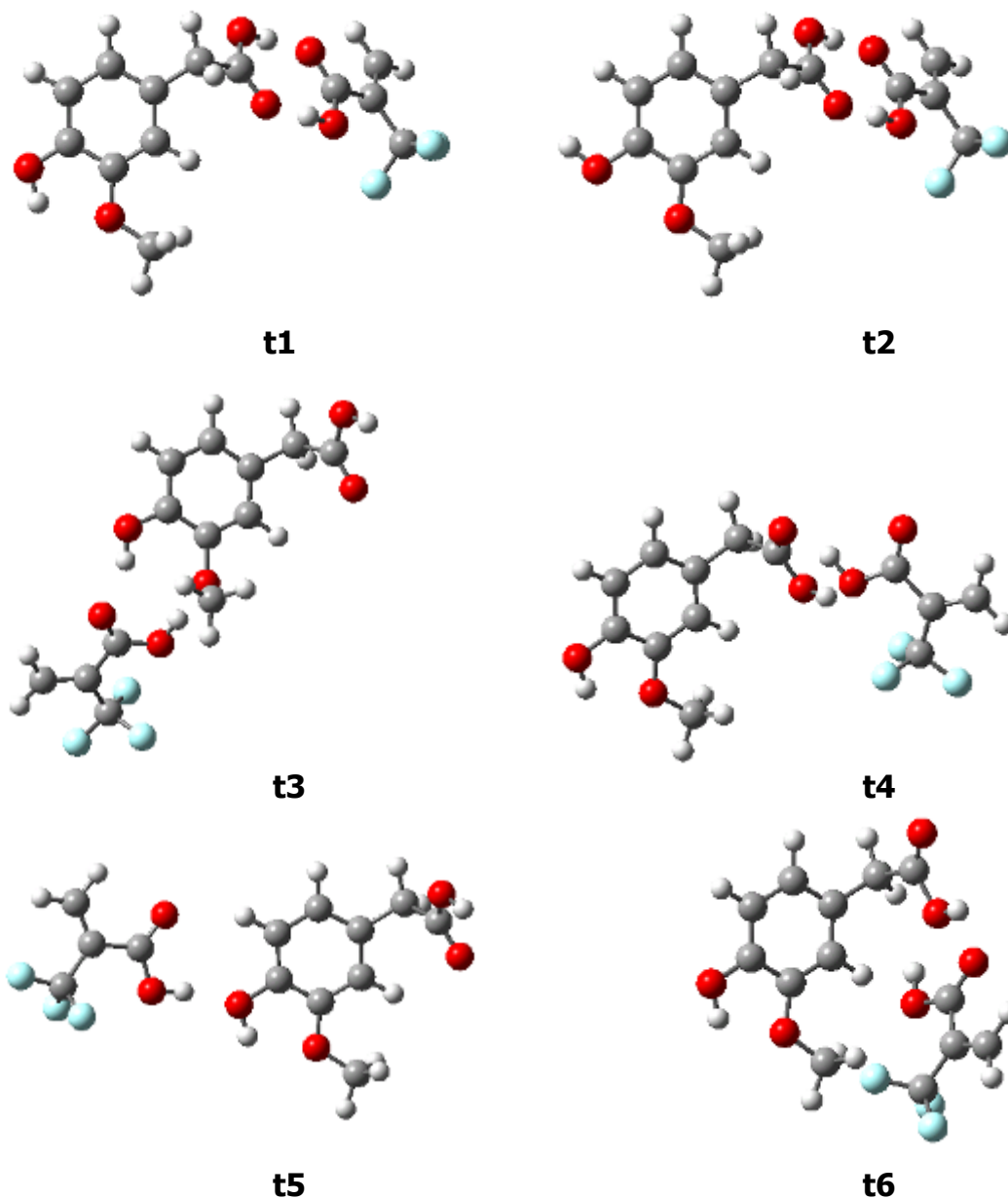
La geometría del monómero funcional 2-trifluorometacrílico (TFMAA) optimizada al nivel B3LYP/6-31G* se presenta en la figura 4.2.



Figura 4.2.- Geometría optimizada del TFMAA.

La energía absoluta del monómero aislado es de -604.3873 unidades atómicas al nivel B3LYP/6-311+G**//B3LYP/6-31G*.

Como consecuencia de la amplia búsqueda conformacional realizada se localizaron un número importante de complejos formados por una molécula de HVA y otra de TFMAA. En la figura 4.3 se muestran las geometrías optimizadas de los diez complejos HVA-TFMAA más estables.



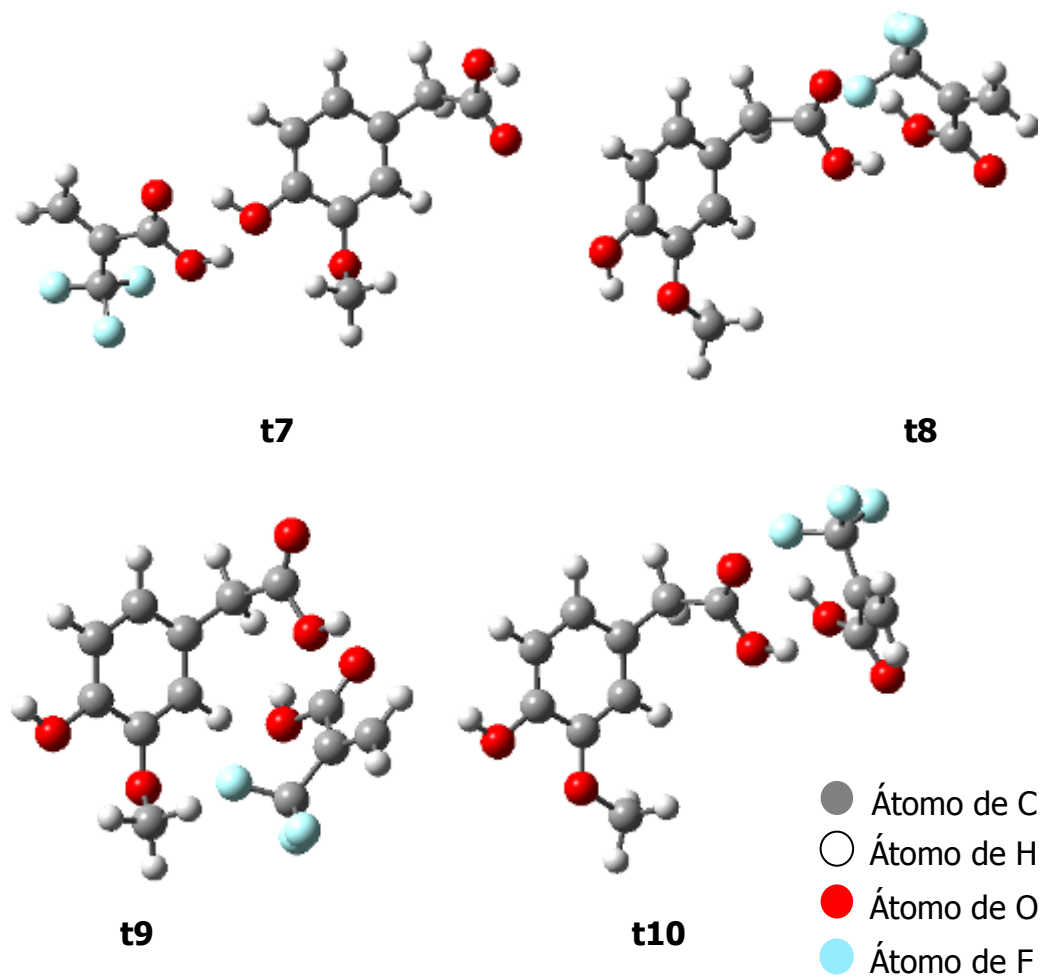


Figura 4.3.- Geometrías optimizadas de los complejos HVA-TFMAA localizados.

A continuación, se detallan las energías electrónicas, entalpías, entropías y energías de Gibbs de estabilización en fase gas, así como las energías de Gibbs de estabilización en disolución para los complejos anteriores.

A. Energías electrónicas de estabilización

La tabla 4.1 recoge los diez complejos HVA-TFMAA más estables ordenados de mayor a menor estabilidad. Las columnas de la tabla muestran la energía electrónica absoluta, la energía de punto cero (ambas para las moléculas separadas y para los complejos) y la energía electrónica de dichos complejos relativa a las moléculas separadas o energía de estabilización.

Tabla 4.1.- Energías electrónicas de los diez complejos HVA-TFMAA más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e+ZPVE)$ kcal/mol
HVA	-650.0744	113.9	
TFMAA	-604.3873	45.7	
HVA+TFMAA	-1254.4817	159.6	0.0
t1	-1254.4950	160.7	-19.8
t2	-1254.4874	160.5	-15.3
t3	-1254.4823	160.4	-12.1
t4	-1254.4823	160.4	-12.1
t5	-1254.4820	160.3	-12.0
t6	-1254.4810	160.4	-11.3
t7	-1254.4750	160.4	-7.6
t8	-1254.4743	160.1	-7.4
t9	-1254.4719	160.0	-6.0
t10	-1254.4669	160.0	-2.8

En comparación con la energía electrónica de las moléculas separadas, el complejo **t1** es el más estable con una energía electrónica de estabilización de 19.8 kcal/mol, seguido del complejo **t2** que es 4.5 kcal/mol menos estable que el primero. Como era de esperar, los dos complejos más estables son los que presentan un doble puente de hidrógeno entre los grupos ácido de ambas moléculas. La causa de la desestabilización de **t2** frente a **t1** es la orientación del hidrógeno hidroxílico que en **t2** impide la formación del puente de hidrógeno intramolecular. El complejo que sigue en estabilidad, **t3**, posee una energía electrónica relativa de -12.1 kcal/mol. En este caso, el complejo presenta un doble puente de hidrógeno entre el grupo ácido del TFMAA y los grupos hidroxilo y metóxido del HVA.

En los complejos **t6** y **t9** las dos moléculas interactúan a través del grupo ácido del TFMAA y del hidroxilo ácido del HVA, diferenciándose en el puente de hidrógeno intramolecular del HVA. En cuanto a las estructuras **t4**, **t8** y **t10**, el doble puente de hidrógeno se establece entre el grupo ácido del HVA y el hidroxilo ácido del TFMAA, variando la conformación del hidrógeno ácido del TFMAA en **t4** respecto a **t8** y **t10**. **t8** forma un puente de hidrógeno intramolecular en el HVA a diferencia de lo que ocurre en **t10**. Los complejos **t5** y **t7** se estabilizan gracias a la interacción entre el grupo ácido del TFMAA y el hidroxilo del HVA.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

Las energías electrónicas no son observables experimentalmente y además no incluyen los factores que determinan si la formación de los complejos es espontánea o no. Para superar esta limitación, se ha realizado un estudio mediante termodinámica estadística que ha permitido

obtener las entalpías, entropías y energías libres de estabilización para la fase gas que se recogen en la tabla 4.2.

Tabla 4.2.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-TFMAA.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta G(\text{gas})$ (kcal/mol)
HVA+TFMAA	0.0	0.0	0.0
t1	-19.6	-11.2	-8.4
t2	-15.0	-11.2	-3.8
t3	-11.7	-10.2	-1.5
t4	-11.7	-9.9	-1.8
t5	-11.3	-8.9	-2.4
t6	-10.9	-10.4	-1.5
t7	-7.1	-9.4	2.3
t8	-6.8	-9.1	2.3
t9	-5.4	-10.8	5.3
t10	-2.3	-9.6	7.3

La primera observación que cabe realizar es que las entalpías relativas tienen valores próximos a las energías electrónicas relativas, lo cual indica que estas últimas son las que más contribuyen a la variación de entalpía. El hecho de que se formen complejos a partir de las moléculas separadas hace que, obviamente, la entropía de los mismos sea siempre inferior a la del estado de referencia. La influencia negativa de la entropía hace que sólo se formen espontáneamente los seis primeros complejos en fase gas. **t1** es el complejo más favorable en fase gas, siendo su energía de Gibbs de estabilización de 8.4 kcal/mol.

C. Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos HVA-TFMAA

Los datos del apartado anterior no tienen una utilidad práctica directa puesto que el procedimiento experimental de impresión molecular no se realiza en fase gas sino en disolución. Los cálculos mecanocuánticos permiten conocer la energía de las moléculas separadas y de los complejos en el seno de un disolvente considerado como un dieléctrico continuo que se caracteriza por su constante dieléctrica. De este modo, es posible calcular teóricamente la energía de estabilización HVA-TFMAA en diferentes disolventes.

En este trabajo teórico se utilizan cinco disolventes habitualmente empleados como disolventes porogénicos: tolueno ($\epsilon = 2.4$), cloroformo ($\epsilon = 4.9$), diclorometano ($\epsilon = 8.9$), acetonitrilo ($\epsilon = 36.6$) y agua ($\epsilon = 80.1$) con el fin de decidir cuál da lugar a complejos más estables dentro de este amplio rango de constantes dieléctricas. Las energías libres de estabilización obtenidas para los cinco disolventes estudiados se detallan en la tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-TFMAA en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo y agua.

Estructuras	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG
	Tolueno (kcal/mol)	Cloroformo (kcal/mol)	Dicloro (kcal/mol)	Acetonitrilo (kcal/mol)	Agua (kcal/mol)
HVA+TFMAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
t1	-17.1	-15.4	-14.2	-14.7	-6.9
t2	-12.9	-11.9	-11.0	-11.8	-4.9
t3	-8.6	-7.8	-6.6	-7.2	1.3
t4	-8.9	-7.6	-6.5	-7.1	0.6
t5	-9.6	-8.6	-7.7	-8.2	-3.6
t6	-6.6	-5.7	-4.2	-5.2	2.3
t7	-4.6	-4.0	-2.9	-3.7	2.7
t8	-4.0	-2.7	-1.5	-2.2	4.6
t9	-1.2	-1.6	-0.3	-1.6	3.2
t10	-0.1	0.7	1.5	0.6	6.7

En general, tolueno, cloroformo, diclorometano y acetonitrilo favorecen la formación de complejos HVA-TFMAA, en el sentido de que en fase gas sólo es espontánea la formación de seis complejos mientras en disolución está favorecida la formación de hasta nueve complejos. En todos los complejos estudiados el tolueno es el disolvente que da lugar a una mayor estabilización seguido del cloroformo, acetonitrilo y diclorometano. Cuando se emplea el agua como disolvente, se observa una desestabilización de los complejos con respecto a las energías de Gibbs en fase gas. Debido a este especial comportamiento, se realizó un estudio para evaluar si el agua interfiere en las interacciones responsables de la formación de los complejos molde-monómero.

D. Estudio de las interacciones de moléculas de agua con la molécula molde (HVA) y el monómero (TFMAA)

Cuando se considera el agua como un medio continuo en cuyo seno se forman los complejos molde-monómero, éstos son considerablemente menos estables que en los otros disolventes investigados. Para comprender las razones de la poca estabilización exploramos la posibilidad de que el agua interactúe con las moléculas de molde y monómero y así dificulte su interacción mutua por puentes de hidrógeno. Para esto, se incluye explícitamente en el cálculo una serie de moléculas discretas de agua saturando las posiciones susceptibles de formación de puentes de hidrógeno y se realiza la modelización del sistema en un medio continuo de agua.

Inicialmente, se realizaron los cálculos tomando como referencia la energía de cada molécula de agua discreta, sin interactuar entre ellas, pero es más realista suponer que dos moléculas de agua aisladas interactúan entre sí formando dímeros, de ahí que, en lo sucesivo, para todas las interacciones con moléculas de agua hablemos en realidad de dímeros de agua.

Las geometrías de los complejos resultantes se presentan en la figura 4.4.



Figura 4.4.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables para TFMAA y HVA interaccionando con dímeros de agua.

La estabilidad de estos dos complejos se compara con la obtenida con **t1**, el complejo HVA-TFMAA más estable. En la tabla 4.4 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 4.4.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-dímero H₂O, TFMAA-dímero H₂O y HVA-TFMAA en agua.

Estructuras	ΔG agua (kcal/mol)
HVA-dímero H₂O	-7.6
TFMAA-dímero H₂O	-12.4
HVA-TFMAA (t1)	-6.9

A la vista de los resultados, se concluyó que el agua compite con el HVA por los sitios de unión del TFMAA, es decir, el monómero TFMAA tiene mayor tendencia a interactuar con el agua que con el HVA. Por lo tanto puede explicarse que el complejo HVA-TFMAA en agua (-6.9 kcal/mol) sea más desfavorable que en fase gas (-8.4 kcal/mol). En consecuencia, el agua no sería un buen disolvente porogénico para sintetizar el polímero molecularmente impreso con TFMAA y HVA, puesto que tiende a formar puentes de hidrógeno muy estables con el monómero y con la molécula molde, dificultando la atracción entre ambos.

4.2.3.- Interacción HVA-MA

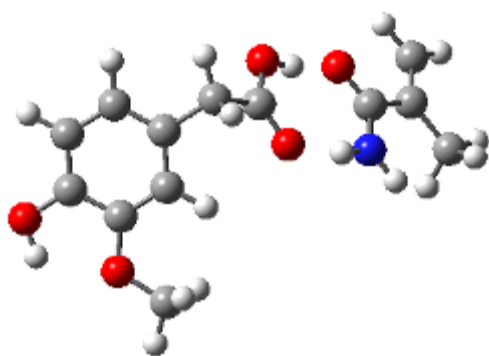
La geometría del monómero funcional 2-metacrilamida (MA) optimizada al nivel B3LYP/6-31G* se presenta en la figura 4.5.



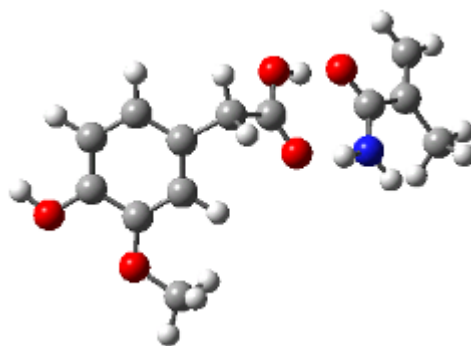
Figura 4.5.- Geometría optimizada de MA.

La energía absoluta del monómero aislado es -286.7041 unidades atómicas al nivel B3LYP/6-311+G**//B3LYP/6-31G*.

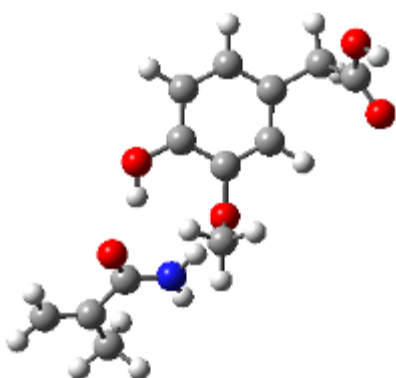
De forma análoga al TFMAA, la búsqueda conformacional efectuada dio lugar a la localización de diez complejos HVA-MA cuyas geometrías optimizadas se muestran en la figura 4.6.



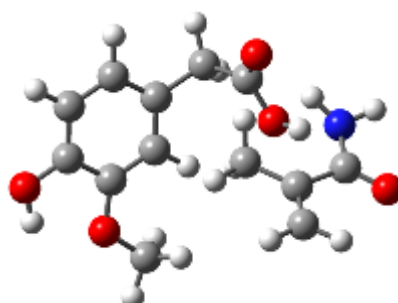
ma1



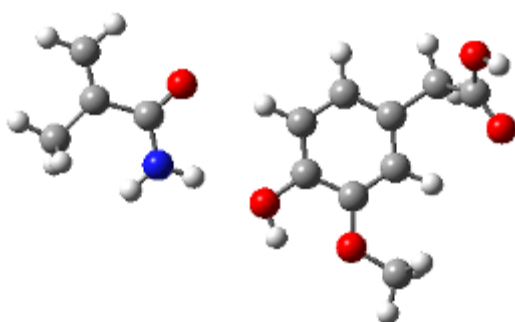
ma2



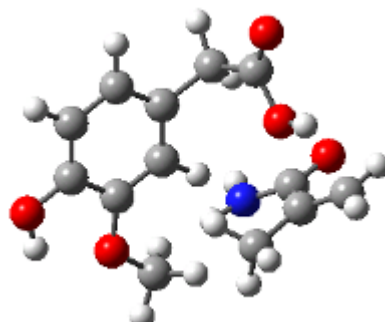
ma3



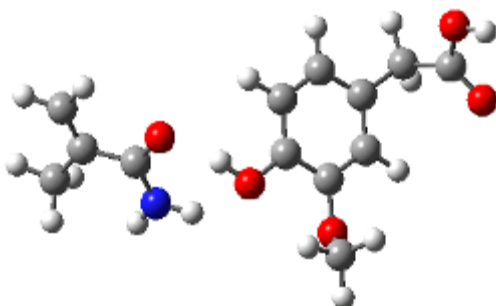
ma4



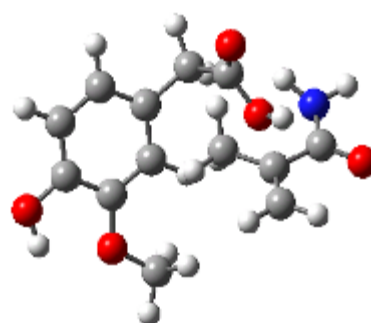
ma5



ma6



ma7



ma8

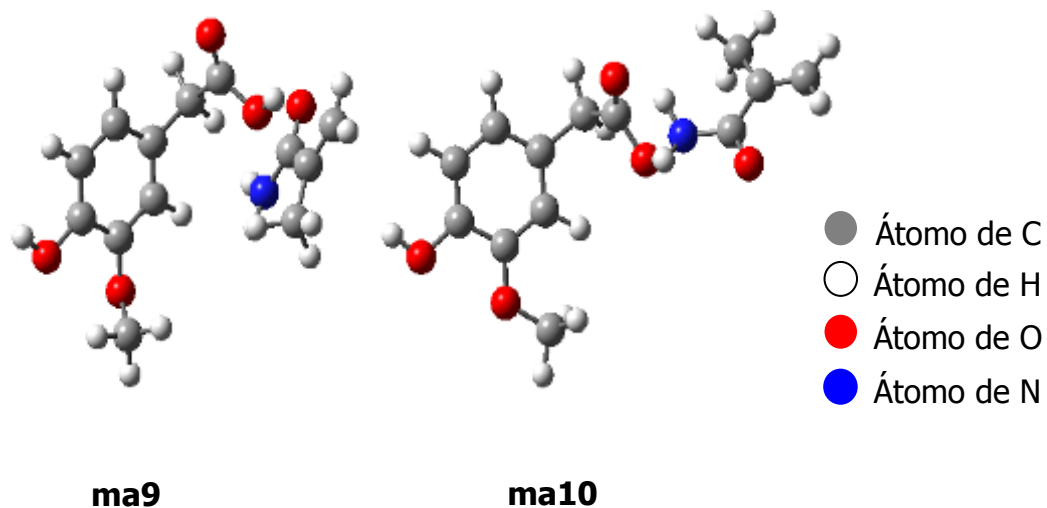


Figura 4.6.- Geometrías optimizadas de los complejos HVA-MA localizados.

Al igual que en la interacción HVA-TFMAA, se procedió a realizar los estudios que se detallan a continuación.

A. Energías electrónicas de estabilización

En la tabla 4.5 se resumen las energías absolutas y relativas, incluyendo la corrección de punto cero, de los diez complejos HVA-MA.

Tabla 4.5.- Energías electrónicas de los diez complejos HVA-MA más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e+ZPVE)$ kcal/mol
HVA	-650.0744	113.9	
MA	-286.7041	67.6	
HVA+MA	-936.7785	181.5	0.0
ma1	-936.8025	182.9	-13.6
ma2	-936.7951	182.8	-9.1
ma3	-936.7895	182.5	-6.0
ma4	-936.7874	183.0	-4.0
ma5	-936.7863	182.3	-4.0
ma6	-936.7921	182.6	-7.4
ma7	-936.7866	182.6	-3.9
ma8	-936.7874	183.0	-4.0
ma9	-936.7824	182.1	-1.9
ma10	-936.7796	182.8	0.6

El complejo HVA-MA más estable, **ma1**, presenta un doble puente de hidrógeno entre el grupo amida de MA y el grupo carboxilo del HVA, de la misma forma que **t1**. Su estabilización es de 13.6 kcal/mol. **ma2** es similar a **ma1**, aunque menos estable (4.5 kcal/mol) debido a que el HVA no posee en este caso la estabilización adicional del puente de hidrógeno intramolecular. Por último, el complejo **ma3** posee una energía electrónica de estabilización de 6.0 kcal/mol. En este caso se establece un doble puente de hidrógeno entre el grupo amida de MA y los grupos hidroxilo y metóxido del HVA. El resto de complejos interaccionan de forma análoga a los complejos descritos para TFMAA, por lo que en este apartado no se describirán.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

A partir del estudio termodinámico estadístico realizado a los complejos HVA-MA se obtuvieron los resultados que se detallan en la tabla 4.6 para la fase gas.

Tabla 4.6.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-MA.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta G(\text{gas})$ (kcal/mol)
HVA+MA	0.0	0.0	0.0
ma1	-13.6	-10.9	-2.7
ma2	-9.0	-11.0	1.9
ma3	-5.6	-10.1	4.5
ma4	-3.9	-10.7	6.9
ma5	-3.4	-8.9	5.5
ma6	-7.1	-9.8	2.7
ma7	-3.6	-9.5	5.9
ma8	-3.9	-10.7	6.9
ma9	-1.3	-9.2	7.9
ma10	0.8	-10.4	11.2

De igual forma que en los aductos de TFMAA, las entalpías relativas tienen valores próximos a las energías electrónicas relativas, lo que indica que estas últimas son las que más contribuyen a la variación de la entalpía. De nuevo, la influencia negativa de la entropía hace que sólo el complejo **ma1** se forme espontáneamente en fase gas.

C. Influencia de los disolventes en la estabilización de los complejos HVA-MA

Las energías relativas de los complejos HVA-MA respecto de las moléculas separadas en los cinco disolventes estudiados, tolueno ($\epsilon = 2.4$), cloroformo ($\epsilon = 4.9$), diclorometano ($\epsilon = 8.9$), acetonitrilo ($\epsilon = 36.6$) y agua ($\epsilon = 80.1$), se recogen en la tabla 4.7.

Tabla 4.7.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-MA en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo y agua.

Estructuras	ΔG Tolueno (kcal/mol)	ΔG Cloroformo (kcal/mol)	ΔG Dicloro (kcal/mol)	ΔG Acetonitrilo (kcal/mol)	ΔG Agua (kcal/mol)
HVA+MA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ma1	-11.7	-10.4	-6.2	-9.8	-3.1
ma2	-7.7	-6.9	-9.2	-7.0	-1.7
ma3	-2.9	-2.4	-1.3	-2.0	2.8
ma4	-0.4	0.6	2.1	1.2	6.8
ma5	-1.9	-1.4	-0.6	-1.3	1.1
ma6	-4.2	-3.4	-2.2	-3.3	3.4
ma7	-1.8	-1.1	-0.1	-0.8	1.9
ma8	-0.4	0.7	2.2	1.3	6.7
ma9	1.1	0.9	1.5	0.5	4.0
ma10	2.7	3.1	4.0	3.0	6.2

Los cinco disolventes favorecen la formación de los complejos HVA-MA, puesto que en fase gas sólo resulta espontánea la formación de **ma1**. El tolueno, de nuevo es el disolvente que conduce a una mayor estabilización del complejo, seguido de cloroformo y acetonitrilo. Al igual que sucedía para los complejos con TFMAA, el diclorometano y el agua son los disolventes más desfavorables.

D. Estudio de las interacciones de moléculas de agua con la molécula molde (HVA) y el monómero (MA)

Nuevamente, los complejos molde-monómero son menos estables en agua que en el resto de disolventes estudiados. Este hecho podría explicarse si el agua interaccionase con la molécula molde y el monómero funcional dificultando la interacción del complejo a través de puentes de hidrógeno. Para confirmar esta sospecha, se realiza el cálculo con dos moléculas de agua saturando las posiciones susceptibles de puentes de hidrógeno del monómero funcional y la molécula molde, sumergido a su vez todo el sistema en agua. Los complejos resultantes se muestran en la figura 4.7.

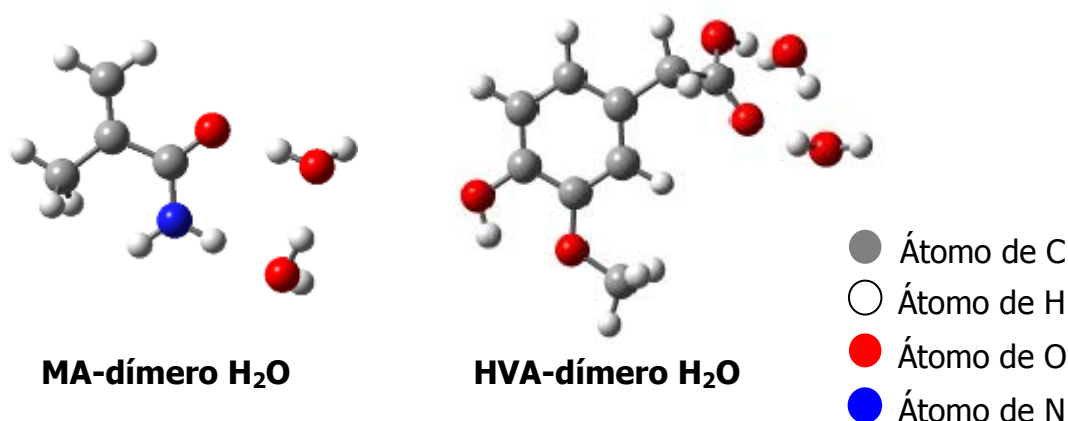


Figura 4.7.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables para MA y HVA interaccionando con dos moléculas de agua.

La estabilidad de estos dos complejos se compara con la obtenida con **ma1**, el complejo HVA-MA más estable. En la tabla 4.8 se resumen los datos obtenidos.

Tabla 4.8.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-dímero H₂O, MA-dímero H₂O y HVA-MA en agua.

Estructuras	ΔG agua (kcal/mol)
HVA-dímero H₂O	-7.6
MA-dímero H₂O	-6.8
HVA-MA (ma1)	-3.1

Los complejos optimizados muestran que el agua compite con MA por los sitios de unión del HVA, es decir, el HVA interactúa más favorablemente con el agua que con el monómero funcional MA. Por tanto, puede explicarse que la formación del complejo HVA-MA en agua (-3.1 kcal/mol) sea más desfavorable que con el resto de disolventes ensayados. Nuevamente, el agua no sería un buen disolvente porogénico para sintetizar el polímero molecularmente impreso para el HVA, puesto que tiende a formar puentes de hidrógeno con el monómero y la molécula molde, desestabilizando la formación de un aducto entre ambos.

4.2.4.- Interacción HVA-MAA

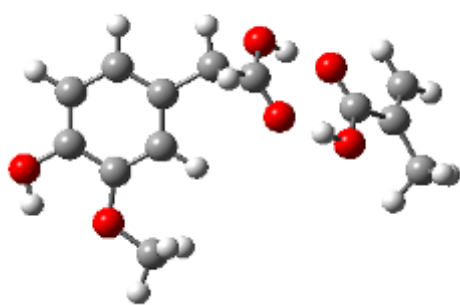
La geometría del monómero funcional ácido metacrílico (MAA) optimizada al nivel B3LYP/6-31G* se presenta en la figura 4.8.



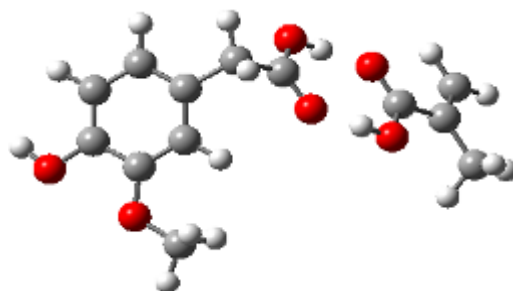
Figura 4.8.- Geometría optimizada del MAA.

La energía absoluta del monómero aislado es -306.5810 unidades atómicas al nivel B3LYP/6-311+G**//B3LYP/6-31G*.

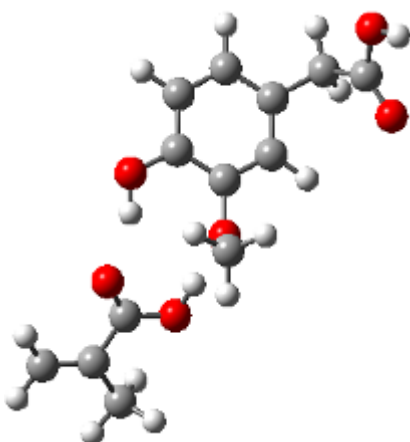
Como consecuencia de la amplia búsqueda conformacional realizada, y del mismo modo que en casos precedentes, se localizaron un número importante de complejos formados por una molécula de HVA y otra de MAA. En la figura 4.9 se pueden ver las geometrías optimizadas de los diez complejos HVA-MAA más estables.



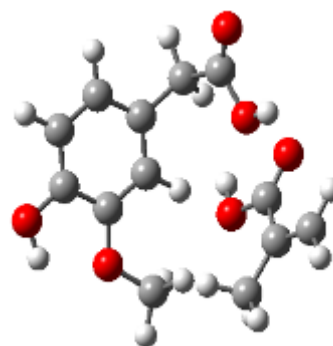
m1



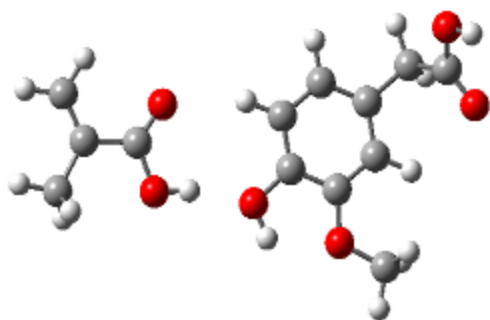
m2



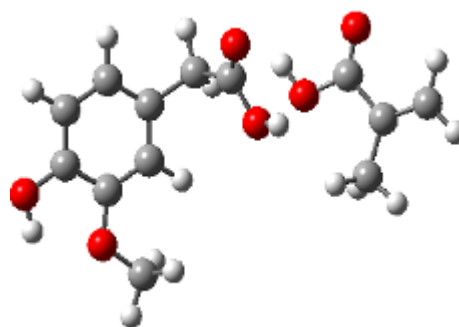
m3



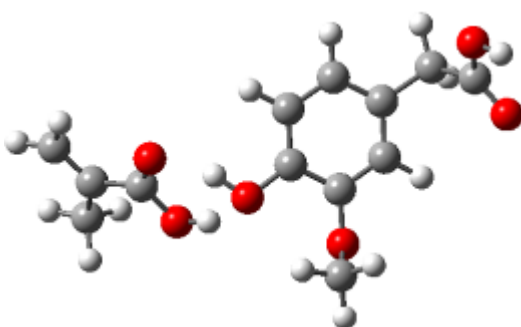
m4



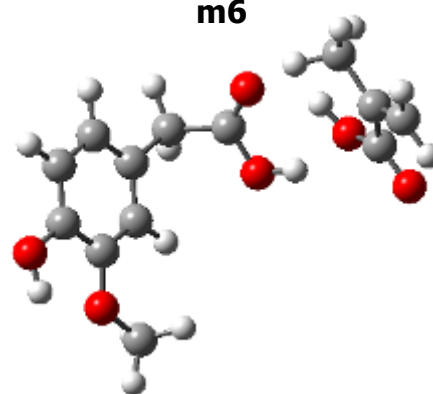
m5



m6



m7



m8

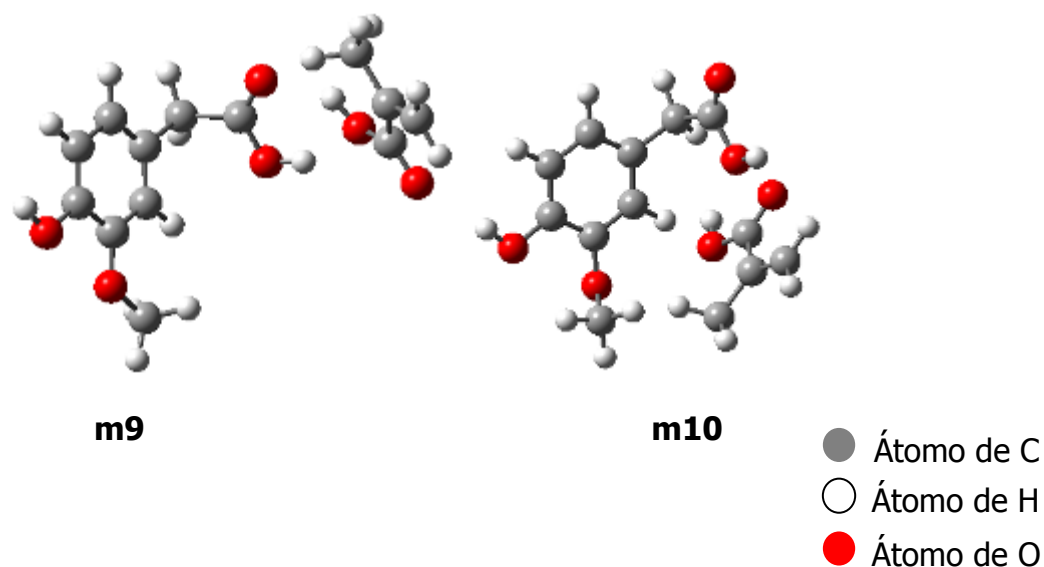


Figura 4.9.- Geometrías optimizadas de los complejos HVA-MAA localizados.

A. Energías electrónicas de estabilización

La tabla 4.9 recoge los diez complejos HVA-MAA más estables ordenados de mayor a menor estabilidad. Las columnas de la tabla muestran la energía electrónica absoluta, la energía de punto cero (calculadas ambas tanto para las moléculas separadas como para los complejos formados) y la energía electrónica de dichos complejos en comparación con la energía de las moléculas separadas.

Tabla 4.9.- Energías electrónicas de los diez complejos HVA-MAA más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e+ZPVE)$ kcal/mol
HVA	-650.0744	113.9	
MAA	-306.5810	60.2	
HVA+MAA	-956.6555	174.1	0.0
m1	-956.6811	175.2	-15.0
m2	-956.6735	175.0	-10.4
m3	-956.6680	175.0	-7.0
m4	-956.6666	175.0	-6.0
m5	-956.6659	175.0	-5.6
m6	-956.6663	174.8	-6.0
m7	-956.6617	175.0	-2.9
m8	-956.6611	175.0	-2.6
m9	-956.6578	174.5	-1.0
m10	-956.6535	174.9	2.1

En comparación con la suma de la energía electrónica de las moléculas separadas, el complejo **m1** es el más estable con una energía electrónica de estabilización de 15.0 kcal/mol, seguido del complejo **m2** que es 4.6 kcal/mol menos estable que el primero. Como era de esperar, los dos complejos más estables son los que presentan un doble puente de hidrógeno entre los grupos ácido de ambas moléculas. La causa de la desestabilización de **m2** frente a **m1** es la orientación en **m2** del hidrógeno hidroxílico que impide la formación del puente de hidrógeno intramolecular. El complejo **m3**, que posee una energía electrónica relativa de -7.0 kcal/mol, es más inestable que **m1** y **m2**, ya que en este caso se establece un doble puente de hidrógeno entre el grupo ácido del MAA y los grupos hidroxilo y metóxido del HVA.

Los complejos **m4** y **m9** interactúan a través del grupo ácido del MAA y del hidroxilo ácido del HVA, diferenciándose en el puente de hidrógeno intramolecular del HVA. En cuanto a las estructuras **m5**, **m8** y **m10**, el doble puente de hidrógeno se establece entre el grupo ácido del HVA y el hidroxilo ácido del MAA, variando la conformación del hidrógeno ácido del MAA en **m5** respecto a **m8** y **m10**. **m8** forma un puente de hidrógeno intramolecular con el HVA a diferencia de **m10**. Los complejos **m6** y **m7** se estabilizan gracias a la interacción entre el grupo ácido del MAA y el hidroxilo del HVA.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

El estudio realizado mediante termodinámica estadística permite obtener los resultados resumidos en la tabla 4.10 para la fase gas.

Tabla 4.10.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-MAA.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta G(\text{gas})$ (kcal/mol)
HVA+MAA	0.0	0.0	0.0
m1	-14.8	-11.0	-3.8
m2	-10.2	-11.2	1.0
m3	-6.6	-10.2	3.7
m4	-5.7	-10.6	4.9
m5	-5.1	-9.5	4.4
m6	-5.3	-7.3	1.9
m7	-2.5	-9.5	6.9
m8	-2.3	-10.0	7.7
m9	-0.5	-10.2	9.8
m10	2.4	-10.2	12.5

La influencia negativa de la entropía hace que sólo el complejo **m1** se forme espontáneamente en fase gas, siendo su energía de Gibbs de estabilización de 3.8 kcal/mol.

C. Influencia de los disolventes en la estabilización de los complejos HVA-MAA

Las energías relativas de los complejos HVA-MAA respecto de las moléculas separadas en los cinco disolventes estudiados, tolueno ($\epsilon = 2.4$), cloroformo ($\epsilon = 4.9$), diclorometano ($\epsilon = 8.9$), acetonitrilo ($\epsilon = 36.6$) y agua ($\epsilon = 80.1$), se detallan en la tabla 4.11.

Tabla 4.11.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-MAA en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo y agua.

Estructuras	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG
	Tolueno (kcal/mol)	Cloroformo (kcal/mol)	Dicloro (kcal/mol)	Acetonitrilo (kcal/mol)	Agua (kcal/mol)
HVA+MAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
m1	-16.5	-14.9	-9.8	-14.2	-2.8
m2	-12.5	-11.3	-6.8	-11.4	-3.2
m3	-7.5	-6.9	-2.0	-6.5	4.2
m4	-6.1	-5.0	0.1	-4.7	7.5
m5	-6.6	-5.4	-1.3	-4.9	6.0
m6	-6.0	-5.1	-2.2	-4.9	-0.5
m7	-4.4	-3.5	1.4	-3.3	5.4
m8	-3.0	-1.7	2.3	-1.5	9.8
m9	-0.8	-0.9	3.6	-1.0	7.8
m10	1.0	1.8	5.3	1.5	9.4

De nuevo encontramos que, exceptuando el caso del diclorometano y el agua, la incorporación al cálculo del disolvente porogénico favorece la formación de complejos HVA-MAA, en el sentido de que en fase gas sólo es espontánea la formación del complejo **m1** mientras en disolución se forman los nueve primeros complejos. En los ocho complejos más estables, el tolueno es el disolvente que da lugar a una mayor estabilización, seguido del cloroformo y del acetonitrilo.

D. Estudio de las interacciones de moléculas de agua con la molécula molde (HVA) y el monómero (MAA)

Al igual que en los apartados precedentes, se estudia la inclusión de dos moléculas de agua en el cálculo. Los complejos resultantes se muestran en la figura 4.10.



Figura 4.10.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables para MAA y HVA interaccionando con dímeros de agua.

La estabilidad de estos dos complejos se compara con la obtenida con **m1**, el complejo HVA-MAA más estable formado por una molécula de HVA y otra de MAA. En la tabla 4.12 se recogen los datos obtenidos.

Tabla 4.12.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-dímero H₂O, MAA-dímero H₂O y HVA-MAA en agua.

Estructuras	ΔG agua (kcal/mol)
HVA-dímero H₂O	-7.6
MAA-dímero H₂O	-15.7
HVA-MAA (m1)	-2.8

A la vista de los resultados, el agua compite con el HVA por los sitios de unión del MAA, es decir, el monómero MAA tiene mayor tendencia a interaccionar con el agua que con el HVA. De este modo, puede explicarse que el complejo HVA-MAA en agua (-2.8 kcal/mol) sea más desfavorable que en fase gas (-3.8 kcal/mol). Nuevamente, se puede afirmar que el agua no es un buen disolvente porogénico para sintetizar el polímero molecularmente impreso con MAA y HVA, puesto que tiende a formar puentes de hidrógeno muy estables con el monómero y con la molécula molde.

4.2.5.- Interacción HVA-VPY

El monómero funcional 4-vinilpiridina (VPY) presenta sólo un centro con capacidad para formar puentes de hidrógeno: el nitrógeno piridínico. En la figura 4.11 puede verse su geometría optimizada al nivel B3LYP/6-31G*.



Figura 4.11.- Geometría optimizada de VPY.

La energía absoluta del monómero aislado es -325.7713 unidades atómicas al nivel B3LYP/6-311+G**//B3LYP/6-31G*.

La búsqueda conformacional efectuada dio lugar a la localización de tres complejos HVA-VPY cuyas geometrías optimizadas se presentan en la figura 4.12.

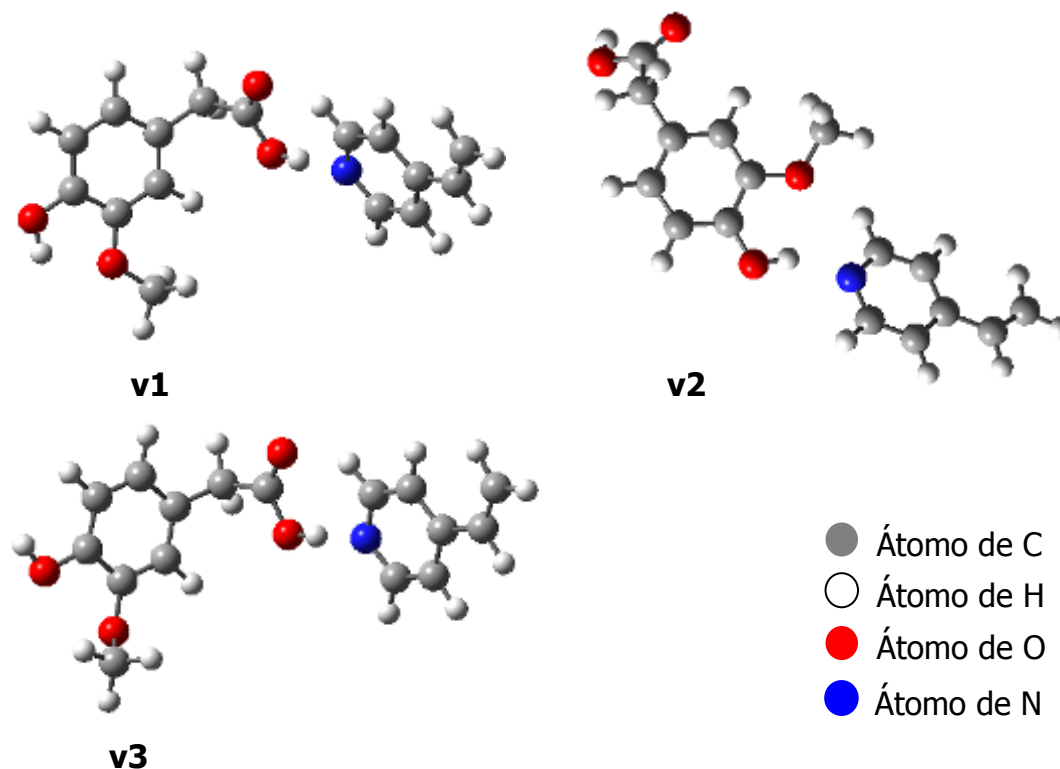


Figura 4.12.- Geometrías optimizadas de los complejos HVA-VPY localizados.

A. Energías electrónicas de estabilización

En la tabla 4.13 se muestran las energías absolutas y relativas, incluyendo la corrección de punto cero, de los tres complejos HVA-VPY.

Tabla 4.13.- Energías electrónicas de los tres complejos HVA-VPY más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a.)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e + ZPVE)$ (kcal/mol)
HVA	-650.0744	113.9	
VPY	-325.7713	76.6	
HVA+VPY	-975.8457	190.4	0.0
v1	-975.8630	191.3	-10.0
v2	-975.8547	191.1	-5.0
v3	-975.8538	191.8	-4.7

El complejo HVA-VPY más estable, **v1**, presenta un puente de hidrógeno entre el hidrógeno ácido del HVA y el nitrógeno piridínico de la molécula de VPY, y está favorecido por el puente de hidrógeno intramolecular en el HVA. Su estabilización es de 10.0 kcal/mol. **v3** es análogo a **v1**, aunque menos estable (4.7 kcal/mol) porque la molécula de HVA no posee en este caso la estabilización adicional del puente de hidrógeno intramolecular. En **v2** la interacción entre ambas moléculas se produce a través del hidrógeno hidroxílico del HVA y el nitrógeno piridínico de VPY, siendo su energía de estabilización de 5.0 kcal/mol.

Dada la marcada basicidad de VPY, se intentó localizar un complejo en el que el hidrógeno ácido del HVA hubiese sido transferido al nitrógeno piridínico, pero todas las búsquedas condujeron finalmente a los complejos de la figura 4.12.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

El estudio termodinámico estadístico realizado a los complejos HVA-VPY arrojó los resultados de la tabla 4.14 para la fase gas.

Tabla 4.14.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-VPY.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta G(\text{gas})$ (kcal/mol)
HVA+VPY	0	0	0
v1	-9.5	-9.8	0.2
v2	-4.4	-9.1	4.7
v3	-4.1	-8.9	4.9

Cabe destacar que la influencia negativa de la entropía hace que ningún complejo se forme espontáneamente en fase gas.

C. Influencia de los disolventes en la estabilización de los complejos HVA-VPY

Las energías relativas de estabilización de los complejos HVA-VPY respecto de las moléculas separadas en los disolventes estudiados se recogen en la tabla 4.15.

Tabla 4.15.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-VPY en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo y agua.

Estructuras	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG
	Tolueno (kcal/mol)	Cloroformo (kcal/mol)	Dicloro (kcal/mol)	Acetonitrilo (kcal/mol)	agua (kcal/mol)
HVA+VPY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
v1	-8.0	-6.6	-5.6	-6.4	0.6
v2	-2.8	-3.0	-2.1	-3.3	0.1
v3	-2.7	-2.4	-1.8	-2.6	1.3

Exceptuando el caso del agua, la inclusión del disolvente favorece la formación de los complejos HVA-VPY. Para **v1** y **v3**, el tolueno es el disolvente que conduce a una mayor estabilización, mientras que **v2** es más estable en acetonitrilo.

D. Estudio de las interacciones de moléculas de agua con la molécula molde (HVA) y el monómero (VPY)

Como en apartados anteriores, se estudia la inclusión de dos moléculas de agua en el cálculo. Los complejos resultantes se presentan en la figura 4.13.

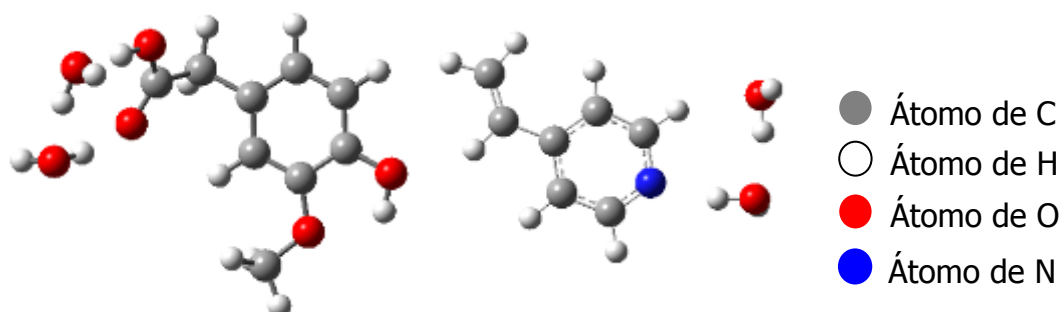


Figura 4.13.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables para VPY y HVA interaccionando con dímeros de agua.

La estabilidad de estos dos complejos se compara con la obtenida con **v1**, el complejo HVA-VPY más estable. En la tabla 4.16 se resumen los datos obtenidos.

Tabla 4.16.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-dímero H₂O, VPY-dímero H₂O y HVA-VPY en agua.

Estructuras	ΔG agua (kcal/mol)
HVA-dímero H₂O	-7.6
VPY-dímero H₂O	-9.3
HVA-VPY (v1)	0.6

A la vista de los resultados, el agua compite con el HVA por los sitios de unión de la molécula de VPY, es decir, el monómero VPY tiene mayor tendencia a interactuar con el agua que con el HVA. Por lo tanto puede explicarse que la formación del complejo HVA-VPY en agua (+0.6 kcal/mol) sea más desfavorable que en fase gas (+0.2 kcal/mol). Como en los casos anteriores, el agua no es un buen disolvente porogénico para sintetizar el polímero molecularmente impreso con VPY y HVA, puesto que tiende a formar puentes de hidrógeno muy estables con el monómero y con la molécula molde.

4.2.6.- Selección del mejor monómero

Uno de los principales objetivos del presente trabajo es la selección del monómero funcional que da lugar a la mayor interacción con la molécula molde HVA.

Después de localizar los complejos más estables formados con los cuatro monómeros considerados, MAA, VPY, TFMAA y MA, estamos en condiciones de comparar sus energías libres de estabilización en distintos disolventes.

Dada la dificultad encontrada a posteriori para sintetizar polímeros impresos con estos cuatro monómeros en los disolventes que arrojaron los peores resultados y usarlos en la validación del método computacional, se amplió el cálculo a un sexto disolvente, el dimetilsulfóxido (DMSO) que sí permitía la disolución de los monómeros y la molécula molde. Este disolvente tiene una constante dieléctrica de $\epsilon=46.7$, superior a la del acetonitrilo ($\epsilon=36.6$) pero muy inferior a la del agua ($\epsilon=80.1$). Como se puede ver en la tabla 4.17, las energías de estabilización en este disolvente son más altas que las obtenidas en agua, y del orden de las calculadas para en los disolventes de diclorometano o acetonitrilo.

Tabla 4.17.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-TFMAA, HVA-MAA, HVA-MA y HVA-VPY más estables en los disolventes tolueno, cloroformo, diclorometano, acetonitrilo, agua y DMSO.

Estructuras	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG
	Tolueno (kcal/mol)	Clorof (kcal/mol)	Dicloro (kcal/mol)	Aceto (kcal/mol)	Agua (kcal/mol)	DMSO (kcal/mol)
HVA-TFMAA (t1)	-17.1	-15.4	-14.2	-14.7	-6.9	-13.9
HVA-MAA (m1)	-12.5	-10.9	-9.8	-10.3	-2.8	-9.5
HVA-MA (ma1)	-11.7	-10.4	-6.2	-9.8	-3.1	-6.3
HVA-VPY (v1)	-6.6	-6.6	-5.6	-4.5	0.6	-5.5

Considerando el disolvente más favorable, tolueno, se encuentra que el complejo más estable es HVA-TFMAA, **t1**, con una energía de estabilización de 17.1 kcal/mol, seguido del complejo HVA-MAA (12.5 kcal/mol).

Por tanto, los cálculos teóricos realizados en este trabajo indican que el monómero funcional óptimo que da lugar a interacciones más fuertes con la molécula molde HVA es el TFMAA.

4.2.7.- Interacciones 1-2

Hasta este momento se han considerado interacciones 1-1 entre la molécula molde y los monómeros funcionales estudiados. Otra situación que podría presentarse en el sistema real es que dos moléculas de un mismo monómero interaccionasen con una molécula de HVA. Esto sería muy deseable, puesto que de esta forma el receptor final tendría dos puntos de anclaje, lo que favorecería la selectividad. Para explorar esta posibilidad, se realizó una búsqueda conformacional incluyendo tres moléculas en cada complejo, dos de monómero y una de molde. Los complejos más estables localizados para TFMAA, MA, MAA y VPY se muestran en la figura 4.14.

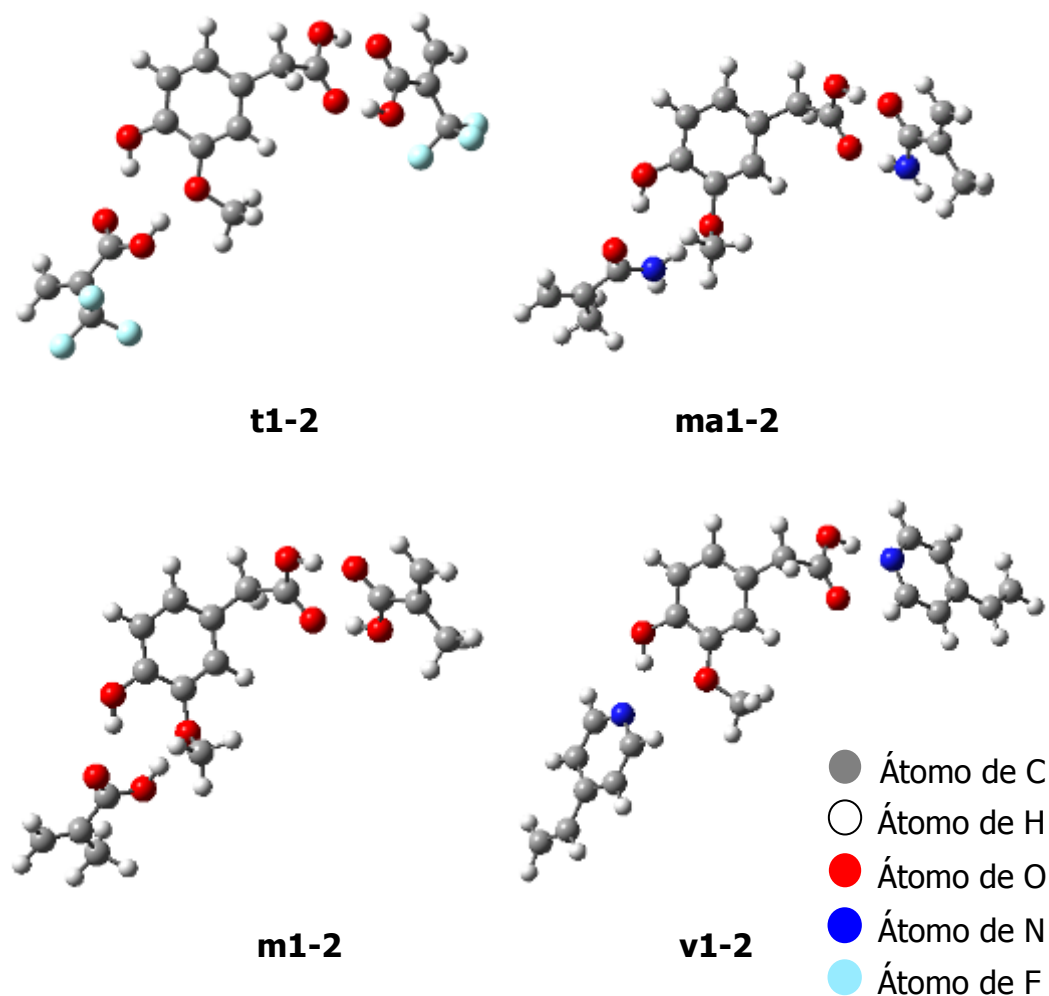


Figura 4.14.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por una molécula de HVA y dos moléculas de monómero funcional TFMAA (**t1-2**), MA (**ma1-2**), MAA (**m1-2**) y VPY (**v1-2**).

Al igual que para las interacciones 1.1, se procedió a realizar los estudios que se detallan a continuación.

A. Energías electrónicas de estabilización

En la tabla 4.18 se recogen las energías absolutas y relativas de los complejos **t1-2**, **ma1-2**, **m1-2** y **v1-2**.

Tabla 4.18.- Energías electrónicas de los complejos HVA-2TFMAA, HVA-2MA, HVA-2MAA y HVA-2VPY más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a.)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e+ZPVE)$ (kcal/mol)
HVA+2TFMAA	-1858.8490	205.3	0.0
t1-2	-1858.9023	207.3	-31.5
HVA+2MA	-1223.4826	249.1	0.0
ma1-2	-1223.5178	251.6	-19.6
HVA+2MAA	-1263.2365	234.2	0.0
m1-2	-1263.2750	236.3	-22.1
HVA+2VPY	-1301.6169	267.0	0.0
v1-2	-1301.6426	268.6	-14.6

Los complejos optimizados muestran que las dos moléculas de monómero interactúan simultáneamente con la molécula molde, pero no interactúan entre sí. Todos los complejos recogidos en la tabla son resultado de la combinación de los complejos 1-1 más estables que implican sitios de unión compatibles. **t1-2** es la combinación de los complejos **t1** y **t3** (figura 4.3), y ocurre de forma análoga para el resto de monómeros.

Se observa que las energías de estabilización de los complejos con dos moléculas de monómero son aproximadamente la suma de las energías de los complejos 1-1 que los describen. Siguiendo esta pauta y con una estabilización menor, podrían formarse otros complejos 1-2 cuya

geometría sería la combinación de dos complejos 1-1 que impliquen distinto grupo funcional en el HVA y cuya energía electrónica de estabilización podría obtenerse aproximadamente por adición de las energías individuales de cada complejo.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

El estudio termodinámico estadístico realizado para los complejos **t1-2**, **ma1-2**, **m1-2** y **v1-2** condujo a los resultados de la tabla 4.19 para la fase gas.

Tabla 4.19.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos **t1-2**, **ma1-2**, **m1-2** y **v1-2**.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta G(\text{gas})$ kcal/mol
HVA+2TFMAA	0.0	0.0	0.0
t1-2	-30.8	-21.0	-9.8
HVA+2MA	0.0	0.0	0.0
ma1-2	-19.2	-21.4	2.2
HVA+2MAA	0.0	0.0	0.0
m1-2	-21.5	-21.3	-0.2
HVA+2VPY	0.0	0.0	0.0
v1-2	-13.5	-19.2	5.8

La variación de energía de Gibbs en fase gas indica que **t1-2** y **m1-2** se formarían espontáneamente en fase gas, mientras **ma1-2** y **v1-2** no se formarían.

C. Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos 1-2

Las energías relativas de estabilización de los complejos 1-2 respecto de las moléculas separadas en los disolventes estudiados se recogen en la tabla 4.20.

Tabla 4.20.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-2TFMAA, HVA-2MA, HVA-2MAA y HVA-2VPY más estables en los disolventes tolueno, cloroformo, acetonitrilo, diclorometano, agua y DMSO.

Estructuras	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG	ΔG
	Tolueno (kcal/mol)	Clorof (kcal/mol)	Aceto (kcal/mol)	Dicloro (kcal/mol)	Agua (kcal/mol)	DMSO (kcal/mol)
HVA+ 2TFMAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
t1-2	-31.5	-23.7	-22.7	-21.4	-7.4	-20.7
HVA+2MA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ma1-2	-14.9	-13.1	-12.8	-11.2	-5.4	-10.5
HVA+2MAA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
m1-2	-16.5	-14.3	-13.2	-12.0	-1.7	-11.3
HVA+2VPY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
v1-2	-10.6	-9.6	-9.9	-8.1	-4.4	-8.0

A la vista de los resultados obtenidos en la tabla 4.20, los disolventes estudiados favorecen la formación de los complejos 1-2. En todos los casos el disolvente que produce una mayor estabilización es el tolueno.

Con los monómeros ácidos y 2-metacrilamida la energía de estabilización que producen los distintos disolventes sigue la tendencia:

tolueno>cloroformo>acetonitrilo>diclorometano>dimetilsulfóxido>agua

Y con el monómero básico, 4-vinilpiridina:

tolueno>acetonitrilo>cloroformo>diclorometano>dimetilsulfóxido>agua

Es de resaltar además, que en contra de lo que cabría esperar basándose en la mera intuición química, los monómeros ácidos como TFMAA (seguido de MAA) producen una estabilización mayor que un monómero básico como VPY en su interacción con una molécula molde de carácter ácido, como el HVA. Esto parece indicar que la formación de puentes de hidrógeno es en este caso la interacción predominante en la formación del aducto de prepolimerización.

4.2.8.- Interacciones HVA-EGDMA

Experimentalmente el polímero impreso se forma con la participación de la molécula molde, el monómero funcional, el disolvente porogénico y un exceso de entrecruzador. Sería interesante saber desde el punto de vista teórico cuál es la energía de interacción entre la molécula molde y una molécula del entrecruzador etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) para saber si este último compite con los monómeros por los sitios de unión de la molécula molde.

Se han localizado tres complejos formados por una molécula de HVA y otra de EGDMA cuyas geometrías optimizadas se muestran en la figura 4.15.

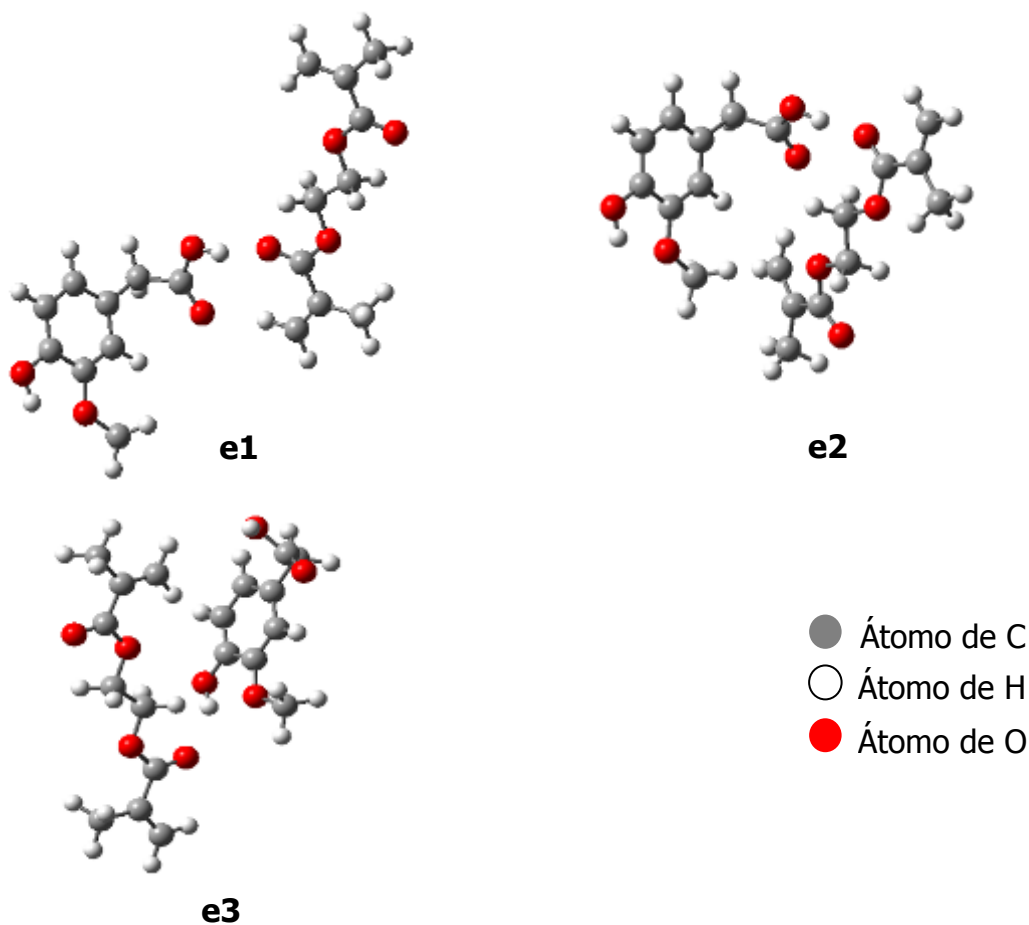


Figura 4.15.- Geometrías optimizadas de los complejos HVA-EGDMA localizados.

A. Energías electrónicas de estabilización

La tabla 4.21 recoge las energías electrónicas de estabilización de los tres complejos HVA-EGDMA localizados corregidas con la energía de punto cero.

Tabla 4.21.- Energías electrónicas de los complejos HVA-EGDMA más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a.)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e+ZPVE)$ (kcal/mol)
HVA	-650.0744	113.9	
EGDMA	-690.5808	143.6	
HVA+EGDMA	-1340.6552	257.5	0.0
e1	-1340.6675	258.6	-6.7
e2	-1340.6651	258.7	-5.1
e3	-1340.6604	258.5	-2.3

En el complejo más estable, **e1**, ambas moléculas interactúan mediante el hidrógeno ácido del HVA y uno de los oxígenos carbonílicos del EGDMA, quedando el resto carbonado del entrecruzador alejado del HVA. En el complejo **e2**, el puente de hidrógeno se establece entre los mismos átomos, pero ahora el entrecruzador tiene su resto carbonado próximo al HVA.

La energía electrónica de estabilización del complejo HVA-EGDMA más estable, 6.7 kcal/mol, es inferior a la de los complejos **t1**, **ma1**, **m1** y **v1**, por lo que se puede deducir que el grupo ácido del HVA interactuará preferentemente con cualquiera de los monómeros considerados en este trabajo antes que con el EGDMA. Por otra parte, la energía de estabilización de **e3** (2.3 kcal/mol) debe compararse con la de **t3** y **t6** para el caso del TFMAA (12.1 y 11.3 kcal/mol), **ma3** y **ma6** para el caso del MA (6.0 y 7.4 kcal/mol), **m3** y **m6** para el caso del MAA (7.0 y 6.0 kcal/mol, respectivamente) y con la de **v2** para el caso de VPY (5.0 kcal/mol), por ser los complejos en los que el HVA interactúa a través del grupo hidroxilo. En los tres casos la estabilización producida por los monómeros funcionales es superior a la que ocasiona el entrecruzador.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

El estudio termodinámico estadístico realizado para los complejos HVA-EGDMA condujo a los resultados de la tabla 4.22 para la fase gas.

Tabla 4.22.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG en fase gas de los complejos HVA-EGDMA.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta G(\text{gas})$ (kcal/mol)
HVA+EGDMA	0.0	0.0	0.0
e1	-6.2	-9.1	2.9
e2	-4.7	-12.4	7.7
e3	-1.8	-12.2	10.3

Una vez más, la importante desestabilización producida por la entropía hace que ninguno de los complejos se forme espontáneamente en fase gas.

C. Influencia de los disolventes en la estabilización de los complejos HVA y EGDMA

En la tabla 4.23 se presentan las energías de Gibbs de estabilización en tolueno, cloroformo y acetonitrilo de los complejos HVA-EGDMA.

Tabla 4.23.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-EGDMA en los disolventes tolueno, cloroformo y acetonitrilo.

Estructuras	ΔG	ΔG	ΔG
	Cloroformo (kcal/mol)	Tolueno (kcal/mol)	Acetonitrilo (kcal/mol)
HVA+EGDMA	0.0	0.0	0.0
e1	-4.1	-4.9	-4.3
e2	4.0	4.2	3.7
e3	1.4	0.9	1.4

A la vista de los resultados obtenidos, únicamente la formación del complejo **e1** sería espontánea en los tres disolventes considerados. El tolueno es el disolvente que más estabiliza este complejo (4.9 kcal/mol), pero siempre menos que a **t1** (17.1 kcal/mol), **m1** (12.5 kcal/mol), **ma1** (11.7 kcal/mol), y a **v1** (6.6 kcal/mol). Así, el HVA interactuará preferentemente con cualquiera de los monómeros en lugar de hacerlo con el EGDMA.

4.2.9.- Energía de interacción entre monómero funcional, molécula molde y disolvente. Aplicación a la selección del disolvente de lavado y de incubación.

El polímero impreso sintetizado de acuerdo con las predicciones teóricas basadas en el cálculo computacional será utilizado como elemento de reconocimiento en un sensor voltamétrico.

El protocolo de trabajo implica realizar la extracción inicial de la molécula molde en un disolvente adecuado, continuando después con una etapa de incubación en la que el analito se fije de manera selectiva al receptor desde un medio apropiado. Por otro lado, la medida voltamétrica requiere que el analito enlazado sea desalojado de los sitios de unión, de manera que pueda difundir hacia la superficie electródica donde se realiza

el intercambio de electrones que permite su detección. Es necesario, por tanto, una cuidadosa optimización del medio de medida. Por tanto, para realizar la extracción o la medida, el disolvente empleado debe tener afinidad, bien sea por la molécula molde, o bien por el monómero funcional, de forma que su interacción compita con la interacción molécula molde-monómero funcional del sitio de unión. Sin embargo, para enlazar la molécula molde al sitio de unión se requiere lo contrario, es decir, que el disolvente no compita con la interacción anteriormente citada y favorecer la unión deseada. En consecuencia, como disolvente de incubación sería apropiado usar el encontrado como óptimo en el proceso de minimización de la energía de estabilización del aducto (tolueno en este caso).

La selección de estos tres medios: lavado o extracción, incubación y medida puede ser asistida por datos teóricos calculados mediante el método computacional desarrollado. Para evaluar este efecto se estudia la interacción de HVA y TFMAA con seis especies químicas como posibles medios de operación: agua, ácido acético, acetato, ácido cítrico, citrato y metanol. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 4.24 y 4.25.

Tablas 4.24 y 4.25.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos HVA-disolvente y TFMAA-disolvente en fase gas y en disolución.

Estructuras	ΔG gas (kcal/mol)	ΔG agua (kcal/mol)
HVA-TFMAA	-8.4	-6.9
HVA-Metanol	+7.0	+16.9
HVA-Acético	-3.4	-3.5
HVA-Acetato	-19.0	+1.1
HVA-cítrico	-8.7	-3.7
HVA-citrato	-2.3	+22.5
HVA-agua	+2.5	+0.3

Estructuras	ΔG gas (kcal/mol)	ΔG agua (kcal/mol)
HVA-TFMAA	-8.4	-6.9
TFMAA-Metanol	-3.6	-4.7
TFMAA-Acético	-9.0	-6.5
TFMAA-Acetato	-29.9	-13.0
TFMAA-cítrico	-7.8	-7.5
TFMAA-citrato	-31.2	-14.3
TFMAA-agua	-3.0	-5.8

Únicamente el ácido acético y el ácido cítrico forman un complejo estable con el HVA en disolución. Sin embargo, las energías de estabilización son en los dos casos inferiores al complejo HVA-TFMAA por lo que difícilmente puede competir con el HVA por el sitio de unión al polímero. Por otro lado, para el TFMAA, las energías de estabilización de sus complejos con el ácido acético, el ácido cítrico y sus bases conjugadas, son superiores a las del complejo HVA-TFMAA, desplazando al HVA del sitio de unión. Esto se traduce en que teóricamente estos cuatro disolventes, o mejor aún, disoluciones reguladoras ácido acético/acetato o ácido cítrico/citrato serían los medios óptimos para el lavado del MIP y para la medida voltamperométrica en disolución.

El lavado, aunque teóricamente podría realizarse en el mismo medio acuoso, en la práctica, requiere de un elevado porcentaje de disolvente orgánico, por un lado, para evitar la deshidratación y el resquebrajamiento de la membrana polimérica y favorecer la humectabilidad de este material altamente hidrofóbico, y por otro, para disolver los productos de oxidación del HVA.

4.3.- Predicciones teóricas de reactividad cruzada

El estudio de la reactividad cruzada con compuestos de estructura similar a la de la molécula molde permite identificar el tipo de interacciones que dan lugar al reenlace.

El método computacional desarrollado en este trabajo permite también realizar el cálculo de las energías de estabilización de los aductos formados por el mejor monómero funcional encontrado y los análogos estructurales seleccionados para estudiar de forma teórica la naturaleza de la interacción en el medio de incubación óptimo (tolueno). De esta manera, se podrían utilizar estas energías de interacción para predecir el grado de reactividad cruzada si dichos compuestos están presentes en la matriz de la muestra. Se han seleccionado para este estudio tanto análogos estructurales con carácter ácido como compuestos con funciones nitrogenadas (de carácter básico). El procedimiento de cálculo de la energía es el mismo que se ha seguido para la predicción del mejor monómero funcional (sección 4.2).

4.3.1.- Reactividad cruzada con análogos estructurales de carácter ácido

Se han modelizado los posibles complejos que puede formar el TFMAA con análogos estructurales al HVA de carácter ácido, como el ácido 3-hidroxi-4-metoxifenilacético o ácido isohomovanílico (IHVA), ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico o ácido vanillilmandélico (VMA), ácido 3-hidroxi-4-metoximandélico o ácido isovanillilmandélico (IVMA), 4-hidroxi-3-metoxifeniletanol o alcohol homovanílico (MHPE) y ácido indolacético (IAA). Sus estructuras se presentan a continuación en la figura 4.16.

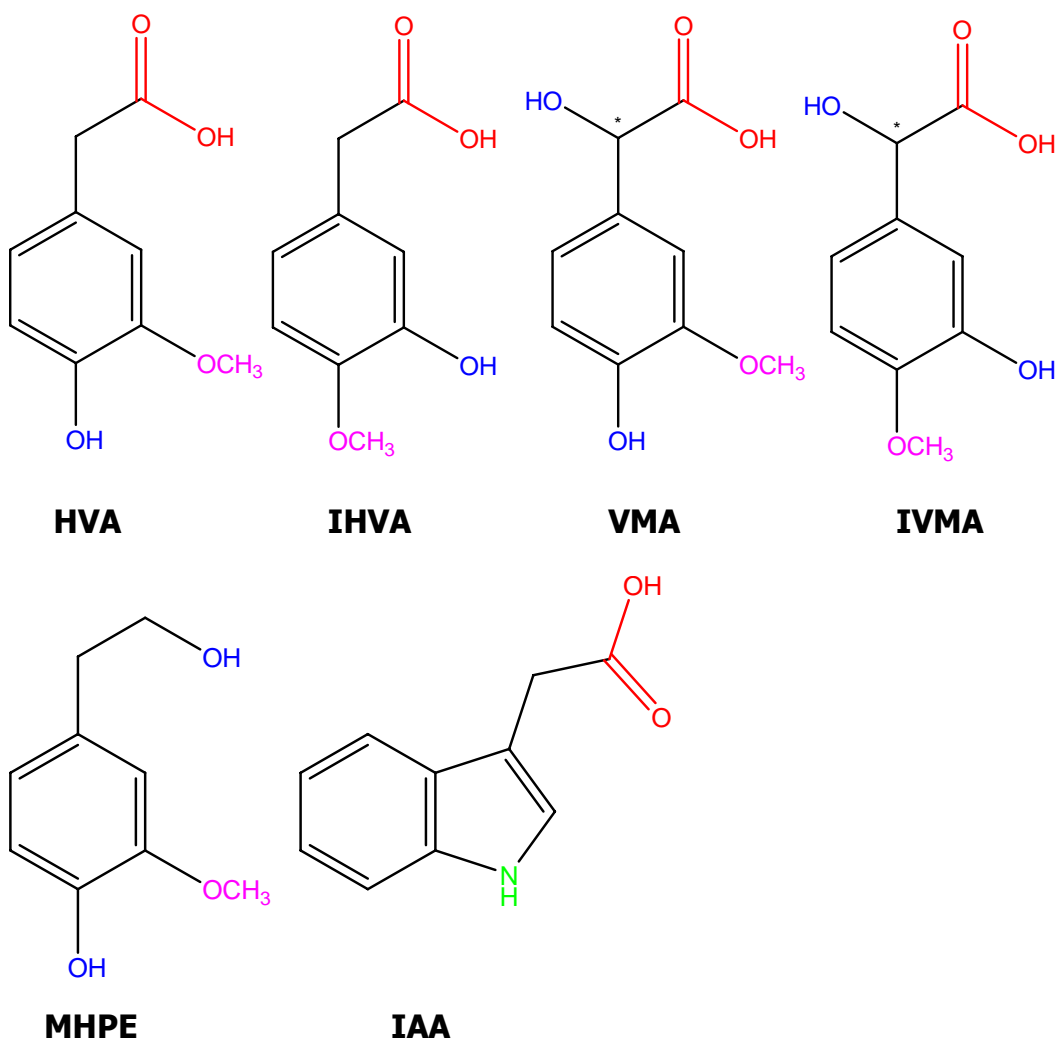


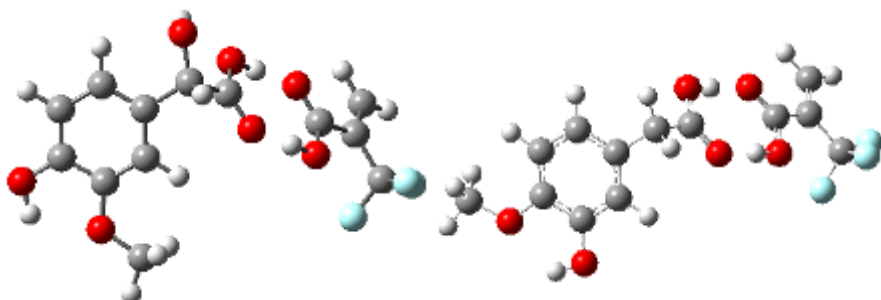
Figura 4.16.- Estructuras de las moléculas de prueba de carácter ácido para la evaluación de la interacción con el monómero funcional.

Cabe destacar que únicamente IVMA es un compuesto exógeno, por lo que no se espera que esté presente en la matriz de las muestras de orina. IHVA, VMA, MHPE son especies endógenas, pertenecientes igual que el HVA a la familia de los metabolitos de catecolaminas. Por último, IAA es un metabolito de la serotonina, y como las moléculas anteriores, también endógeno. Esta consideración es importante tenerla en cuenta cuando se estudie la respuesta del sensor en orina.

Para realizar una primera aproximación a la caracterización DFT de la selectividad del polímero, se calculó la estabilidad de los complejos 1-1 entre el monómero TFMAA y las moléculas anteriores. Se introdujo como disolvente el tolueno, que resultó ser el más favorable para HVA.

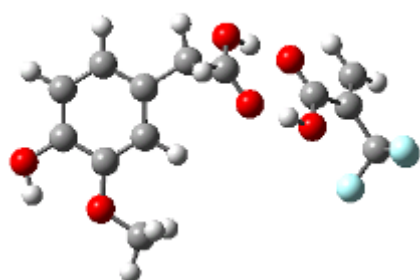
4.3.1.1.- Interacciones 1-1

Las geometrías de los complejos 1-1 más estables entre TFMAA y las moléculas de prueba anteriores se presentan en la figura 4.17.

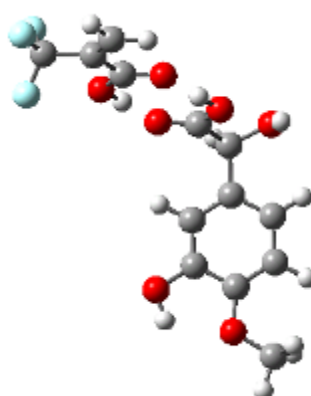


TFMAA-HVA

TFMAA-IHVA



TFMAA-VMA



TFMAA-IVMA

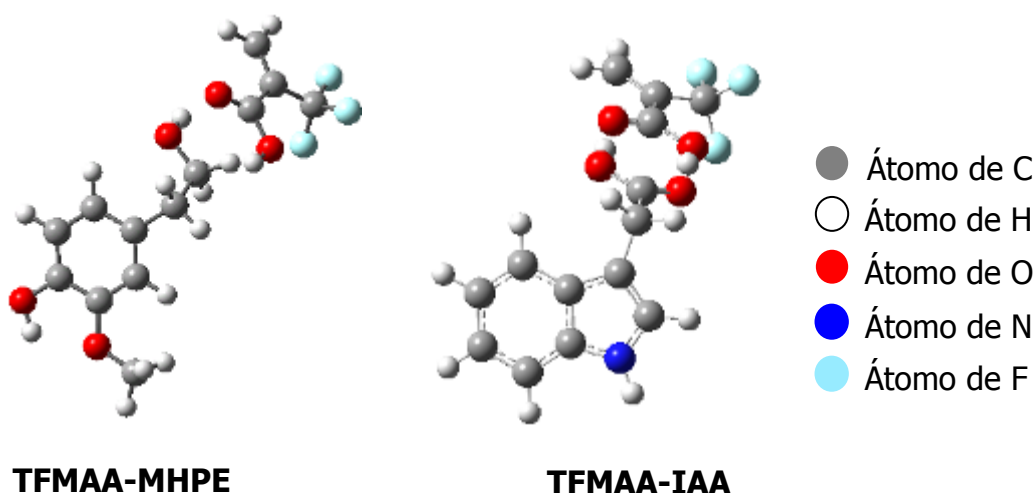


Figura 4.17.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por una molécula de monómero funcional TFMAA y una molécula de HVA, IHVA, VMA, IVMA, MHPE e IAA, respectivamente.

A. Energías electrónicas de estabilización

En la tabla 4.26 se recogen las energías absolutas y relativas de los complejos 1-1 TFMAA-molécula interferente.

Tabla 4.26.- Energías electrónicas de los complejos 1-1 TFMAA-molécula de prueba más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a.)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e+ZPVE)$ (kcal/mol)
TFMAA-HVA	-1254.4950	160.7	-19.8
TFMAA-IHVA	-1254.4944	160.6	-20.0
TFMAA-VMA	-1329.7320	163.3	-20.1
TFMAA-IVMA	-1329.7314	163.3	-20.1
TFMAA-MHPE	-1180.4162	172.3	-13.7
TFMAA-IAA	-1196.2926	155.7	-19.9

Los complejos TFMAA-IHVA, TFMAA-VMA, TFMAA-IVMA y TFMAA-IAA poseen una energía electrónica relativa de 20.0, 20.1 y 19.9 kcal/mol, respectivamente, ligeramente superior a las 19.8 kcal/mol del complejo TFMAA-HVA. Como cabría esperar, los cuatro complejos poseen energías electrónicas similares debido a que forman un doble puente de hidrógeno entre los grupos ácido de ambas moléculas.

En cuanto al complejo TFMAA-MHPE, posee una energía electrónica relativa de 13.7 kcal/mol, muy inferior a la de los complejos discutidos anteriormente. Esto es debido a que el MHPE sólo podría formar un puente de hidrógeno con el monómero funcional, a diferencia de los complejos anteriores, ya que en su estructura tiene un hidroxilo en lugar de un grupo carboxilo terminal.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

El estudio termodinámico estadístico realizado para los complejos 1-1 anteriores condujo a los resultados de la tabla 4.27 para la fase gas.

Tabla 4.27.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG de los complejos 1-1 TFMAA-molécula de prueba más estables en fase gas.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG gas (kcal/mol)
TFMAA-HVA	-19.6	-11.2	-8.4
TFMAA-IHVA	-19.8	-11.4	-8.3
TFMAA-VMA	-19.7	-11.3	-8.4
TFMAA-IVMA	-19.9	-11.3	-8.7
TFMAA-MHPE	-13.5	-10.1	-3.4
TFMAA-IAA	-15.7	-11.8	-8.2

Una de las observaciones que puede realizarse es que las entalpías relativas tienen valores próximos a las energías electrónicas relativas, lo cual indica que éstas últimas son las que más contribuyen a la variación de la entalpía. El factor entrópico es siempre desfavorable debido a que la entropía de los complejos es, en todos los casos, inferior al de las moléculas que lo componen de forma separada. Esto sin embargo, no impide el que se formen espontáneamente todos los complejos citados en fase gas.

C. Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos 1-1

Las energías de Gibbs de estabilización para los complejos monómero-molécula huésped en tolueno se detallan en la tabla 4.28.

Tabla 4.28.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos 1-1 TFMAA-molécula de prueba más estables en tolueno.

Estructuras	ΔG tolueno (kcal/mol)
TFMAA-HVA	-17.1
TFMAA-IHVA	-16.8
TFMAA-VMA	-17.1
TFMAA-IVMA	-17.3
TFMAA-MHPE	-7.0
TFMAA-IAA	-17.2

El tolueno, disolvente más favorable a lo largo de todo el estudio, aumenta la estabilidad de todos los complejos respecto de la fase gas, conduciendo a una estabilidad similar para los complejos con HVA, IHVA, VMA, IVMA e IAA. Al igual que ocurría para la fase gas, el complejo TFMAA-MHPE en tolueno es visiblemente más desfavorable comparado con los tres complejos anteriores.

A modo de resumen se podría concluir que tanto VMA como IVMA, IHVA e IAA forman complejos 1-1 de estabilidad similar al HVA tanto en fase gas como en disolución, lo que implica que interferirán fuertemente en la determinación del HVA en estas condiciones de operación. Sin embargo, también se puede observar que el MHPE forma complejos poco estables con el monómero funcional. La explicación que puede darse a este hecho es que el MHPE se diferencia del resto de moléculas ensayadas, y en concreto del HVA, en la presencia de un grupo hidroxilo en lugar de grupo carboxilo terminal. Esto hace que el MHPE forme un solo puente de hidrógeno con el monómero funcional en lugar del doble puente que forman los complejos anteriores.

A la vista de estos resultados teóricos, la sustitución del grupo ácido del HVA por un grupo hidroxilo modifica drásticamente la estabilidad de los complejos formados o, dicho de otro modo, la formación del doble puente de hidrógeno entre el monómero funcional y la molécula de prueba es la interacción que domina el enlace.

4.3.1.2.- Interacciones 1-2

Las geometrías de los complejos 1-2 más estables entre TFMAA y las moléculas de prueba anteriores se muestran en la figura 4.18.

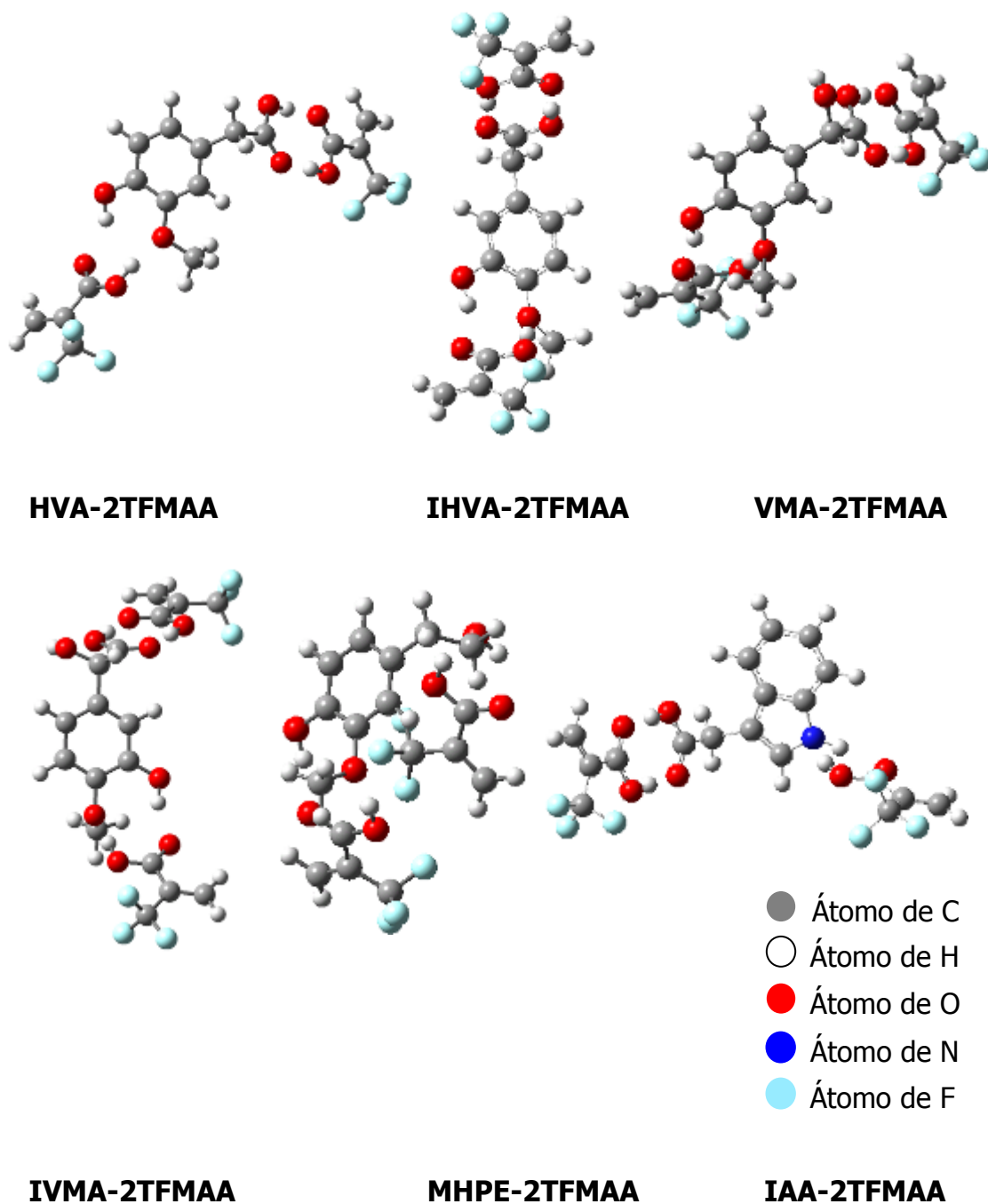


Figura 4.18.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por dos moléculas de monómero funcional TFMAA y una molécula de HVA, IHVA, VMA, IVMA, MHPE e IAA, respectivamente.

A. Energías electrónicas de estabilización

En la tabla 4.29 se recogen las energías absolutas y relativas de los complejos 1-2 molécula de prueba-TFMAA.

Tabla 4.29.- Energías electrónicas de los complejos 1-2 molécula de prueba-TFMAA más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a.)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e+ZPVE)$ (kcal/mol)
HVA-2TFMAA	-1858.9023	207.3	-31.5
IHVA-2TFMAA	-1858.9016	207.2	-31.6
VMA-2TFMAA	-1934.1395	209.8	-32.0
IVMA-2TFMAA	-1934.1394	209.8	-32.4
MHPE-2TFMAA	-1784.8242	219.1	-25.7
IAA-2TFMAA	-1800.6957	202.3	-29.0

De forma análoga a los complejos 1-1, MHPE es la molécula que forma complejos menos favorables con TFMAA. De nuevo, IHVA, VMA, IVMA e IAA conducen a complejos de estabilidades similares al HVA.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

El estudio termodinámico estadístico realizado para los complejos 1-2 anteriores condujo a los resultados de la tabla 4.30 para la fase gas.

Tabla 4.30.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG de los complejos 1-2 molécula de prueba-TFMAA más estables en fase gas.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG gas (kcal/mol)
HVA-2TFMAA	-30.8	-21.0	-9.8
IHVA-2TFMAA	-30.9	-20.0	-10.9
VMA-2TFMAA	-31.1	-21.4	-9.7
IVMA-2TFMAA	-31.7	-21.7	-10.0
MHPE-2TFMAA	-25.3	-24.6	-0.7
IAA-2TFMAA	-28.3	-20.6	-7.7

Como en apartados precedentes, el factor entrópico es siempre desfavorable debido a que la entropía de los complejos es inferior al de las moléculas que lo componen de forma separada. Sin embargo, en este caso, la importante desestabilización producida por la entropía no impide el que se formen espontáneamente todos los complejos citados en fase gas.

C. Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos 1-2

Las energías de Gibbs de estabilización para los complejos 1-2 molécula de prueba-TFMAA en tolueno se muestran en la tabla 4.31.

Tabla 4.31.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos 1-2 molécula de prueba-TFMAA más estables en tolueno.

Estructuras	ΔG tolueno (kcal/mol)
HVA-2TFMAA	-31.4
IHVA-2TFMAA	-41.3
VMA-2TFMAA	-31.7
IVMA-2TFMAA	-31.4
MHPE-2TFMAA	-14.9
IAA-2TFMAA	-38.9

Nuevamente, el tolueno es el disolvente más favorable a lo largo de todo el estudio, aumentando la estabilidad de todos los complejos respecto de la fase gas y conduciendo a una estabilidad similar para los complejos con VMA, IVMA y HVA. Los complejos más estables son los constituidos por IAA e IHVA, ya que forman con los monómeros funcionales dos puentes de hidrógeno dobles, al igual que ocurre con HVA. El complejo con MHPE continúa siendo el más desfavorable en tolueno, en aproximadamente unas 16 kcal/mol. Esto pone de manifiesto la mayor estabilidad de los complejos formados a través del doble puente de hidrógeno de los grupos carboxilo de ambas moléculas, en mayor medida que la interacción a través de los grupos metóxido e hidroxilo en posiciones 3 y 4 respectivamente.

4.3.2.- Reactividad cruzada con compuestos de carácter básico

En el estudio anterior se analizó la interacción con moléculas estructuralmente muy semejantes a la molécula molde. Puesto que el ácido homovanílico se determina fundamentalmente en orina, se

realizaron cálculos con otros compuestos presentes en la matriz que puedan interferir potencialmente en su determinación en este medio: dopamina (D), epinefrina (E), norepinefrina (NE) y normetanefrina (NM). Sus estructuras junto con la del HVA se presentan en la figura 4.19.

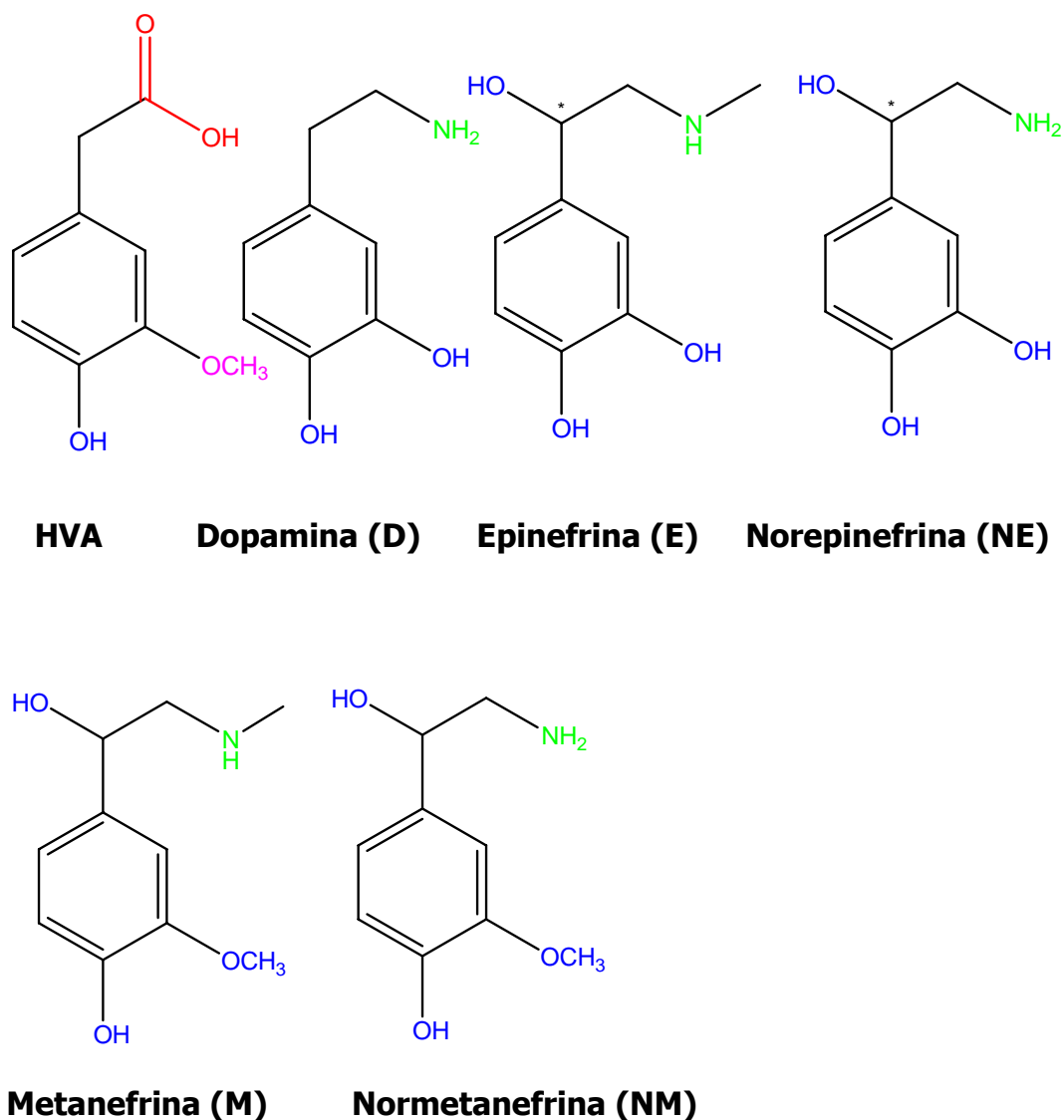


Figura 4.19.- Estructuras de moléculas de carácter básico potencialmente interferentes del HVA.

4.3.2.1.- Interacciones 1-1

Las geometrías de los complejos 1-1 más estables entre TFMAA y las moléculas anteriores se muestran en la figura 4.20.

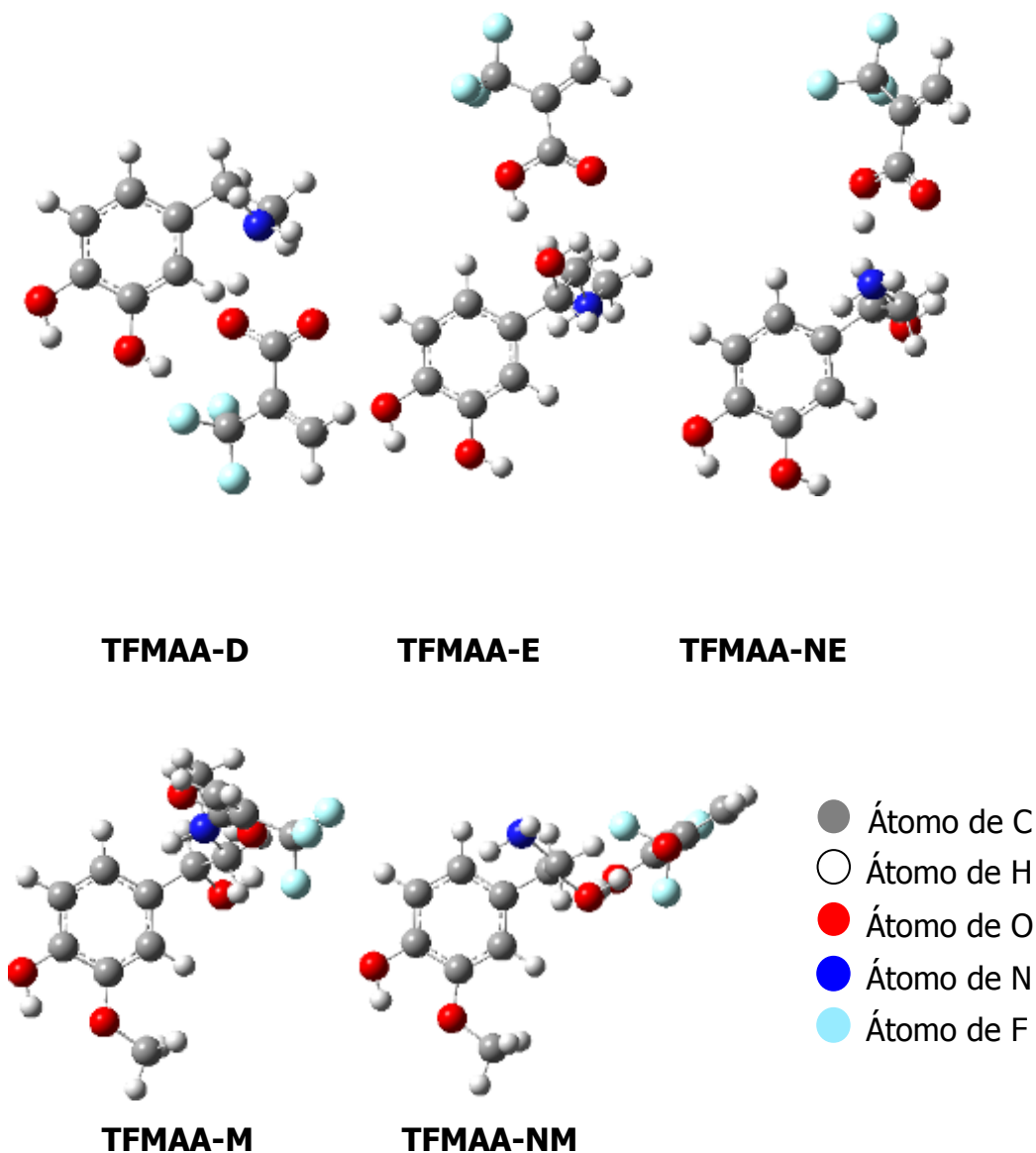


Figura 4.20.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por una molécula de monómero funcional TFMAA y una molécula de dopamina, epinefrina, norepinefrina, metanefrina y normetanefrina, respectivamente.

A. Energías electrónicas de estabilización

En la tabla 4.32 se recogen las energías absolutas y relativas de los complejos 1-1 TFMAA-molécula interferente.

Tabla 4.32.- Energías electrónicas de los complejos 1-1 TFMAA-molécula interferente más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a.)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e+ZPVE)$ (kcal/mol)
TFMAA-HVA	-1254.4950	160.7	-19.8
TFMAA-D	-1121.2386	162.2	-16.4
TFMAA-E	-1235.7976	182.6	-19.0
TFMAA-NE	-1196.0794	164.6	-16.6
TFMAA-M	-1275.1023	200.3	-16.8
TFMAA-NM	-1235.7858	183.1	-14.2

El complejo TFMAA-E tiene una energía electrónica elevada (19 kcal/mol) ya que, al igual que el HVA, forma un doble puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la molécula de epinefrina y el grupo ácido del TFMAA. El resto de los complejos poseen una energía electrónica relativa muy inferior ya que únicamente pueden formar un puente de hidrógeno.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

El estudio termodinámico estadístico realizado para los complejos 1-1 anteriores condujo a los siguientes resultados para la fase gas.

Tabla 4.33.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG de los complejos 1-1 TFMAA-molécula interferente más estables en fase gas.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG gas (kcal/mol)
TFMAA-HVA	-19.6	-11.2	-8.4
TFMAA-D	-16.4	-12.1	-4.4
TFMAA-E	-19.0	-12.3	-6.7
TFMAA-NE	-16.3	-9.2	-7.1
TFMAA-M	-16.4	-9.8	-6.6
TFMAA-NM	-14.0	-10.0	-3.9

A la vista de los resultados, y aunque todos los complejos 1-1 estudiados se formarían espontáneamente en fase gas, ninguno de ellos podría competir con el HVA por los sitios de unión al TFMAA.

C. Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos 1-1

Las energías de Gibbs de estabilización para los complejos monómero-molécula interferente en tolueno se resumen en la tabla 4.34.

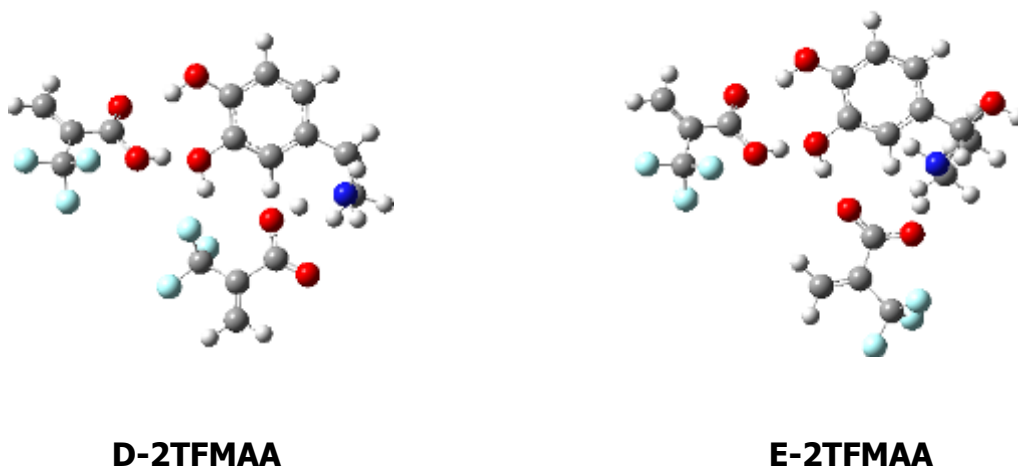
Tabla 4.34.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos 1-1 TFMAA-molécula interferente más estables en tolueno.

Estructuras	ΔG tolueno (kcal/mol)
TFMAA-HVA	-17.1
TFMAA-D	-13.0
TFMAA-E	-15.4
TFMAA-NE	-14.9
TFMAA-M	-11.3
TFMAA-NM	-11.5

El tolueno, disolvente más favorable a lo largo de todo el estudio, aumenta la estabilidad de los complejos respecto de la fase gas, conduciendo a aductos de estabilidad ligeramente inferior que con HVA.

4.3.2.2.- Interacciones 1-2

Las geometrías de los complejos 1-2 molécula interferente-TFMAA más estables se presentan en la figura 4.21.



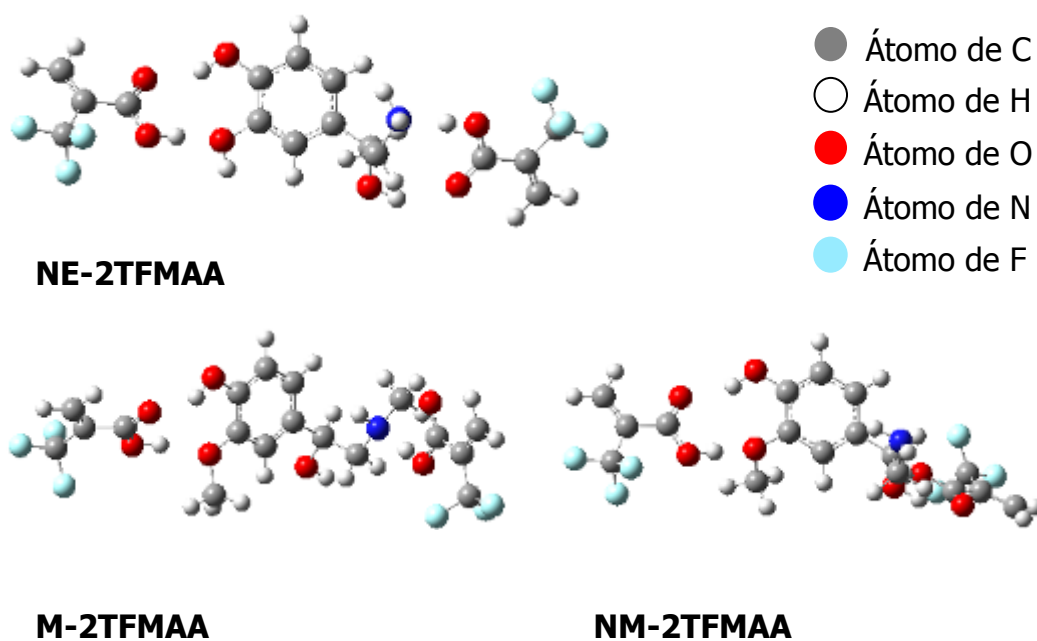


Figura 4.21.- Geometrías optimizadas de los complejos más estables formados por dos moléculas de monómero funcional TFMAA y una molécula de dopamina, epinefrina, norepinefrina, metanefrina y normetanefrina, respectivamente.

A. Energías electrónicas de estabilización

En la tabla 4.35 se recogen las energías absolutas y relativas de los complejos 1-2 molécula interferente-TFMAA.

Tabla 4.35.- Energías electrónicas de los complejos 1-2 molécula interferente-TFMAA más estables.

Estructuras	Energía electrónica absoluta (u.a.)	Energía de punto cero (kcal/mol)	$\Delta(E_e+ZPVE)$ (kcal/mol)
HVA-2TFMAA	-1858.3048	207.2972	-31.5
D-2TFMAA	-1725.6462	209.0118	-28.1
E-2TFMAA	-1840.2095	229.2396	-33.5
NE-2TFMAA	-1800.8890	211.7762	-29.2
M-2TFMAA	-1879.5093	247.0807	-28.2
NM-2TFMAA	-1840.1934	229.7764	-26.0

Fijándonos exclusivamente en la energía de estabilización electrónica, únicamente el complejo E-2TFMAA posee una energía electrónica relativa superior al complejo formado con HVA, ya que en este caso se forma por un lado, un doble puente de hidrógeno entre el grupo ácido de un TFMAA y los grupos hidroxilo de la epinefrina, y por otro, un puente de hidrógeno sencillo entre el átomo de hidrógeno de la otra molécula de TFMAA y el átomo de nitrógeno del grupo amino de la epinefrina, una conformación similar a la obtenida con HVA. El resto de moléculas estudiadas presentan igualmente un doble puente de hidrógeno y un puente de hidrógeno sencillo entre los grupos funcionales de la molécula y los monómeros funcionales, sin embargo forman complejos ligeramente menos estables en fase gas.

B. Entalpía, entropía y energía de Gibbs de estabilización en fase gas

El estudio termodinámico estadístico realizado para los complejos 1-2 anteriores condujo a los resultados de la tabla 4.36 para la fase gas.

Tabla 4.36.- ΔH , $T\Delta S$ y ΔG de los complejos 1-2 molécula interferente-TFMAA más estables en fase gas.

Estructuras	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG gas (kcal/mol)
HVA-2TFMAA	-30.8	-21.0	-9.8
DOPA-2TFMAA	-27.7	-23.1	-4.6
EPI-2TFMAA	-33.1	-22.3	-10.8
NOREPI-2TFMAA	-28.8	-22.0	-6.8
META-2TFMAA	-27.4	-20.2	-7.1
NORMETA-2TFMAA	-25.3	-20.3	-5.0

Aunque todos los complejos 1-2 estudiados se formarían espontáneamente en fase gas, únicamente la epinefrina podría competir de manera significativa con el HVA por los sitios de unión al TFMAA.

C. Influencia del disolvente en la estabilización de los complejos 1-2

Las energías de Gibbs de estabilización para los complejos monómero-molécula potencialmente interferente en tolueno se detallan en la tabla 4.37.

Tabla 4.37.- Energías de Gibbs de estabilización de los complejos 1-2 molécula interferente-TFMAA más estables en tolueno.

Estructuras	ΔG tolueno (kcal/mol)
HVA-2TFMAA	-31.5
DOPA-2TFMAA	-38.3
EPI-2TFMAA	-44.9
NOREPI-2TFMAA	-45.2
META-2TFMAA-	-41.6
NORMETA-2TFMAA	-37.0

El tolueno, disolvente más favorable a lo largo de todo el estudio, aumenta la estabilidad de todos los complejos respecto de la fase gas conduciendo a una estabilidad superior para todas las moléculas estudiadas, particularmente elevada para epinefrina y norepinefrina.

A modo de conclusión, tanto VMA, IVMA, IHVA e IAA que estudiamos con anterioridad, como el resto de metabolitos analizados anteriormente compiten con el HVA por el sitio de unión al polímero en tolueno.

Capítulo 5

Instrumentación, reactivos y procedimientos experimentales

5.1.- Instrumentación

Las técnicas voltamétricas empleadas fueron: voltametría diferencial de pulso (DPV), voltametría cíclica (CV) y amperometría. Se desarrollaron empleando un potencióstato μ -Autolab II (Eco CHEMIE, B. V. Utrech, The Netherlands), con un montaje potencióstático convencional de tres electrodos.

5.1.1.- Electrodos de trabajo

Electrodo de carbono vitrificado (GCE): Para la construcción de sensores basados en polímeros molecularmente impresos se empleó un electrodo de carbono vitrificado de 3 mm de diámetro Metrohm (Gomensoro S.A, Madrid), modificado con una fina película de polímero acrílico molecularmente impreso para HVA. La preparación se describe en el apartado 5.3.4.

Electrodo de pasta de carbono: En el estudio de la capacidad de enlace de los MIPs mediante ensayos de unión se utilizó un electrodo de pasta de carbono de 3 mm de diámetro diseñado en nuestro laboratorio con cuerpo de teflón y contacto tipo pistón de acero inoxidable. Con este electrodo de fabricación manual se llevaron a cabo todas las medidas voltamétricas.

Composición de la pasta de carbono: Se empleó una pasta de carbono y parafina, formada por la mezcla íntima de 5 g de grafito (Ultra Carbon) y 1.8 mL de aceite de parafina (Fluka).

Electrodo auxiliar: Se usó un alambre de platino de 15 mm de longitud y 1 mm de diámetro.

Electrodo de referencia: Se empleó un electrodo de plata / cloruro de plata en disolución saturada de cloruro potásico, por tanto, todos los potenciales que aparecen en este trabajo están referidos a dicho electrodo.

5.1.2.- Instrumentación utilizada en la preparación de sensores voltamétricos basados en MIPs

Para realizar la polimerización se empleó una cámara estanca diseñada en el laboratorio (ver figura 5.1) que consta de una entrada y salida de nitrógeno para que la polimerización se realice en ausencia de oxígeno y un encamisado de acero inoxidable conectado a un criostato de circulación Selecta "Frigiterm-30" que permite mantener la mezcla de polimerización a una temperatura inferior a 4°C (la temperatura de trabajo fue de 2.1°C). El diseño se completa con un rotor de velocidad controlada con entrada a la cámara termostatizada y sobre el que se sitúa un electrodo de carbono vitrificado. Una alícuota de la mezcla de

prepolimerización se deposita sobre la superficie del electrodo y tras un breve tiempo de exposición a radiación ultravioleta (UV) -previamente optimizado- se aplica una velocidad de rotación de 3000 rpm durante 5 segundos. El exceso de mezcla precursora de la polimerización se elimina, dejando una capa fina sobre la que se continúa la polimerización fotoquímica durante 30 minutos con una lámpara UV (Vilmer Lourmat, VL-115 BL) de un máximo de longitud de onda de 365 nm.



Figura 5.1.- (a) Imagen de la cámara de polimerización con el criostato y el rotor de velocidad controlada; (b) vista superior del dispositivo utilizado.

Para llevar a cabo el lavado e incubación del polímero en ensayos de unión se utilizaron un agitador basculante Selecta "Movil-Tub" Ref. 7000913 y una centrífuga P Selecta CENCOM.

La evaporación a sequedad de los extractos de orina se realizó con un termostato de bloque metálico Tembloc Selecta.

La determinación de áreas superficiales, coeficientes de difusión y permeabilidades para electrodos sin modificar o modificados con polímero molecularmente impreso (MIPE) y con polímero no impreso (NIPE) se realizó con un electrodo de carbono vitrificado de 3 mm de diámetro

acoplado a un disco rotatorio Metrohm 628-10 con velocidad de rotación controlada desde 500 hasta 3000 rpm.

Estos experimentos requieren un estricto control de la temperatura, por lo que las medidas electroquímicas se realizaron en una celda termostatazada conectada a un termostato de circulación HAAKE DC1.

Para las medidas de espesor de las capas poliméricas se empleó un microscopio óptico automatizado Leica DMR-XA procedente de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

Previamente, es necesario despegar las membranas de polímero adheridas sobre el electrodo de carbono vitrificado y embutirlas en una mezcla de resina epoxi y endurecedor, transparente al microscopio óptico. Una vez transcurridas 24 h de curado a temperatura ambiente, se cortaron a la mitad de su diámetro con una sierra circular de control numérico para su posterior análisis.

5.2.- Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos comercialmente y usados sin tratamiento previo. Las disoluciones se prepararon con agua purificada mediante un sistema Milli-Q RG, (Millipore). La disolución reguladora fue de citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10 preparada a partir de citrato sódico (Merck) y ácido clorhídrico 37% (Merck). Para desoxigenar o evaporar a sequedad las disoluciones se hizo pasar corriente de nitrógeno, (N₂ N45, Air Liquide, España).

Los monómeros funcionales: ácido 2-trifluorometacrílico (TFMAA), ácido metacrílico (MAA), 2-metacrilamida (MA), 4-vinilpiridina (VPY); el agente entrecruzante: etilenglicoldimetacrilato (EGDMA); el fotoiniciador: 2,2'-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DPP); el iniciador térmico/fotoquímico:

α,α' -azoisobutironitrilo (AIBN); la molécula molde: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético o ácido homovanílico (HVA); las moléculas análogas a la molécula impresora que permitieron evaluar la selectividad del MIP: ácido 3-hidroxi-4-metoxifenilacético o ácido isohomovanílico (IHVA), ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico o ácido vanillilmandélico, (VMA), 4-hidroxi-3-metoxifeniletanol o alcohol homovanílico (MHPE), ácido 3-hidroxi-4-metoximandélico o ácido isovanillilmandélico, (IVMA); así como el cloruro de hexaaminrutenio (III) y el ferricianuro potásico empleados en el estudio electroquímico de la permeabilidad de las capas poliméricas, fueron suministrados por Sigma (Aldrich, España). La resina epoxi y el endurecedor empleados para embutir las capas de polímero fueron proporcionados por Buehler (Biometec Tecnología y Sistemas SAL, España), referencias EpoxiCure 20-8130 y 20-8132, respectivamente. Otros reactivos generales como cloruro sódico 99.5%, cloruro amónico 99.5%, hidróxido potásico 85% y ácido fosfórico 85% fueron facilitados por Sigma (Aldrich, España). Todos los reactivos químicos fueron de grado analítico y los disolventes de calidad HPLC (Fluka, España).

5.3.- Procedimientos experimentales

5.3.1.- Preparación de la superficie de los electrodos de trabajo

La superficie del electrodo de carbono vitrificado fue pulida con alúmina en un trapo de pulido metalográfico, con sucesivo decrecimiento de tamaño de partícula (1-0.3 μm) y las partículas sobrantes en la superficie fueron eliminadas por tratamiento ultrasónico en agua de calidad Milli-Q. A continuación, el electrodo fue oxidado desde -0.250 a +1.200 V vs. Ag/AgCl.

Los electrodos de pasta de carbono se rellenaron con pasta nueva tras cada experimento y se pulieron sobre un papel blanco.

5.3.2.- Preparación de MiPs en pequeña escala (mini-MiPs)

La confirmación de las predicciones realizadas mediante cálculos DFT se realizó mediante la síntesis de polímeros acrílicos a escala reducida (mini-MiPs)¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ en forma de pastilla o película de aproximadamente 50 mg adherida a las paredes del vial. El empleo de este formato a pequeña escala permite eliminar la etapa de molienda y tamizado, por lo que es posible la evaluación rápida de gran número de polímeros. En particular, se pretende determinar con esta metodología el monómero funcional, disolvente y procedimiento de polimerización más adecuado.

Se investigaron tres monómeros funcionales: ácido metacrílico (MAA), 2-metacrilamida (MA) y ácido 2-trifluorometacrílico (TFMAA) en dos disolventes porogénicos: tolueno, el disolvente óptimo según los cálculos teóricos y diclorometano, uno de los disolventes menos favorables. Asimismo se realizó también un estudio comparativo del efecto del iniciador de la polimerización empleando DPP y AIBN en condiciones térmicas y fotoquímicas.

El procedimiento de síntesis se detalla a continuación.

Se prepararon dos disoluciones madre para sintetizar el polímero impreso (MIP) y no impreso (NIP) a partir de 800 μ l de EGDMA (4.24 mmol), 30.8 mg de DPP / 20 mg de AIBN (120 μ mol), y 1800 μ l de tolueno / diclorometano. Para sintetizar el MIP, a la mezcla anterior se le adicionó 25.5 mg de HVA (140 μ mol). A partir de estas disoluciones madre, se tomaron 650 μ l y se transfirieron a un vial con 210 μ mol de cada uno de los tres monómeros estudiados MAA, MA y TFMAA. De esta

disolución, una vez homogeneizada y desgasificada 2 minutos con nitrógeno, se tomaron 65 μl y se llevaron a viales de 2 mL previamente desgasificados. Esta disolución polimerizó fotoquímicamente o térmicamente (65°C), según el caso, durante aproximadamente 2 horas.

La extracción del HVA de la matriz polimérica se llevó a cabo mediante lavado sucesivo con una mezcla de disolventes adecuada. En este trabajo se empleó una mezcla de ácido acético/metanol 1:9 v/v, uno de los disolventes de lavado más utilizados¹²³⁻¹²⁶.

Los polímeros de control o polímeros no impresos (NIPs) fueron tratados del mismo modo para asegurar que los efectos observados se deben al proceso de impresión molecular y no al tratamiento posterior de éstos. La detección del HVA en el sobrenadante se realizó mediante voltametría diferencial de pulso, dando por concluida la etapa de lavado cuando se dejó de observar señal analítica.

Ensayos de unión

Para evaluar las características de reconocimiento molecular de los polímeros acrílicos sintetizados se realizaron ensayos de unión en tolueno y diclorometano adicionando HVA de concentración 52 μM en la disolución de incubación. Las suspensiones de incubación se mantuvieron en un agitador basculante durante 24 horas y a continuación se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos para analizar el líquido sobrenadante.

Como consecuencia de la utilización de disolventes orgánicos inmiscibles con la reguladora utilizada como electrolito de fondo en la determinación voltamétrica, es necesario introducir una etapa previa de evaporación y reconstitución. Así, una vez realizada la incubación y centrifugación, se tomó una alícuota del sobrenadante y se evaporó con

nitrógeno a sequedad. Posteriormente se reconstituyó en un volumen conocido de la reguladora en la que se efectuarán las medidas voltamétricas (citrato/HCl 0.1 M pH=1.10) y se realizó la cuantificación de la especie que permanece en el líquido de incubación mediante voltametría diferencial de pulso, con una amplitud de 50 mV y un tiempo de repetición de 0.5 segundos, barriendo en un intervalo de potencial comprendido entre 0.6 y 0.9 V, y registrándose el pico de oxidación del HVA a 0.806 V. La cuantificación se realizó utilizando una recta de calibrado constituida con patrones puros de HVA.

5.3.3.- Preparación de MIPs en forma de monolito

Una vez confirmados el monómero funcional, disolvente y procedimiento de polimerización más favorable a partir de estudios realizados con mini-MIPs, se sintetizaron MIPs y NIPs en forma de monolito en tolueno (disolvente óptimo según cálculos DFT) y acetonitrilo, disolvente teóricamente poco favorable (secciones 4.2.6 y 4.2.7). El objetivo de este estudio es evaluar las propiedades de enlace de MIPs y NIPs a partir de sus isothermas de adsorción y comparar sus capacidades de reconocimiento.

A continuación se expone el procedimiento de síntesis.

Se preparó una disolución para MIP y NIP a partir de 21.2 mmol de EGDMA, 600 μ mol de iniciador DPP, 7 mL de tolueno/acetonitrilo y 4.2 mmol de monómero funcional. Para sintetizar el MIP, a la disolución anterior se le adicionó 700 μ mol de HVA. La mezcla de polimerización se desgasificó con nitrógeno durante cinco minutos y fotopolimerizó durante toda una noche. Tras la polimerización, el sólido obtenido se molió

manualmente utilizando un mortero de porcelana y se tamizó con un tamiz analítico de 25 μm de luz de malla. La extracción del HVA de la matriz polimérica se llevó a cabo mediante lavado sucesivo con ácido acético/metanol 1:9 v/v, realizándose la detección del HVA en el sobrenadante mediante voltametría diferencial de pulso.

Para determinar la existencia de sangrado del polímero (liberación de pequeñas cantidades de molécula molde residuales) en el disolvente de incubación (tolueno) se realizó previamente a la incubación un lavado en ese disolvente, comprobando que no se observaba señal analítica. De existir sangrado, los resultados que se obtendrían estarían falseados porque parte del analito encontrado en el sobrenadante de incubación correspondería al lavado del HVA en ese medio y no al ensayo propiamente dicho. Una vez comprobado que esto último no sucede, se realizaron los ensayos de incubación correspondientes.

Ensayos de unión

De forma análoga a los mini-MIPs, los ensayos de unión para los MIPs a escala normal se realizaron poniendo en contacto una determinada cantidad de polímero acrílico con una disolución de HVA de concentración fija en el disolvente de interés. La suspensión de incubación se mantuvo en un agitador basculante durante 24 horas, se centrifugó, se evaporó una alícuota del sobrenadante con nitrógeno a sequedad, y se reconstituyó el extracto obtenido en la disolución reguladora de medida (citrato/HCl 0.1 M pH=1.10). La cuantificación del HVA se realizó nuevamente mediante voltametría diferencial de pulso.

5.3.4.- Preparación de los electrodos modificados

Se utilizaron electrodos de carbono vitrificado de 3 mm de diámetro en cuerpo de 10 mm de diámetro externo. La integración del elemento de reconocimiento molecular con el electrodo de carbono vitrificado que actúa como transductor se realizó a través de la creación de una película polimérica porosa sobre la superficie del electrodo siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación.

Mezcla de prepolimerización

Se preparó una disolución de la molécula molde (0.12 mmol), el monómero funcional correspondiente en cada caso (0.72 mmol) y el entrecruzador etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) (2.88 mmol) en 250 μ l del disolvente porogénico seleccionado. La mezcla de polimerización fue desaireada con nitrógeno durante un minuto en un baño de hielo antes y después de la adición de 23.6 mg del fotoiniciador, DPP. Se pipetearon 10 μ l de la mezcla de polimerización sobre la superficie electródica y tras un minuto de irradiación a 365 nm con la lámpara UV, el exceso de mezcla de polimerización fue eliminado por rotación a 3000 rpm. El electrodo modificado se dejó en la cámara de fotopolimerización en atmósfera de nitrógeno a 2.1°C bajo radiación UV durante 30 minutos.

Se preparó un electrodo de control o electrodo modificado con polímero no impreso (NIPE) siguiendo el mismo procedimiento, pero en ausencia de la molécula molde. El electrodo de control tuvo en todo momento el mismo tratamiento que el electrodo impreso para asegurar que los efectos observados son solamente debido a las características de la impresión y no a los posteriores tratamientos a los que se someten los electrodos.

Protocolo de medida

Para comprobar el funcionamiento voltamétrico de los electrodos modificados se desarrolló el siguiente protocolo de medida:

1. En primer lugar, se extrajo la molécula molde de los sitios de unión del polímero mediante lavado del mismo en una disolución de dioxano con un 20% v/v de metanol durante 10 minutos. Se escogió este medio de lavado porque resultó ser el más eficaz para eliminar el HVA.
2. A continuación se comprobó que el registro voltamétrico no presentaba corriente significativa al potencial característico del HVA de 0.85 V.
3. Posteriormente, se procedió a reenlazar la molécula molde en una disolución de tolueno que contenía HVA en una concentración determinada durante un tiempo optimizado de 15 minutos. Los electrodos antes de cada medida se sumergen en acetonitrilo durante 5 segundos para eliminar el HVA débilmente retenido.
4. La cuantificación se realizó en un medio exento de analito donde se favorezca su desprendimiento de los sitios de unión, en este caso, una disolución de citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10 con 40% v/v de acetonitrilo para favorecer el mojado del electrodo. La amplitud del pulso aplicado fue de 50 mV. Las corrientes de pico fueron medidas por sustracción de la línea base. La intensidad de corriente detectada bajo estas condiciones está relacionada con la concentración de analito presente en la etapa de enlace.
5. El electrodo se lavó previamente para usos sucesivos en una disolución de dioxano con un 20% v/v de metanol al igual que en la etapa inicial de extracción, puesto que se encontró que este medio se facilitaba también la disolución de los productos de oxidación del HVA.

La secuencia de las etapas de medida se resume en la figura 5.2.

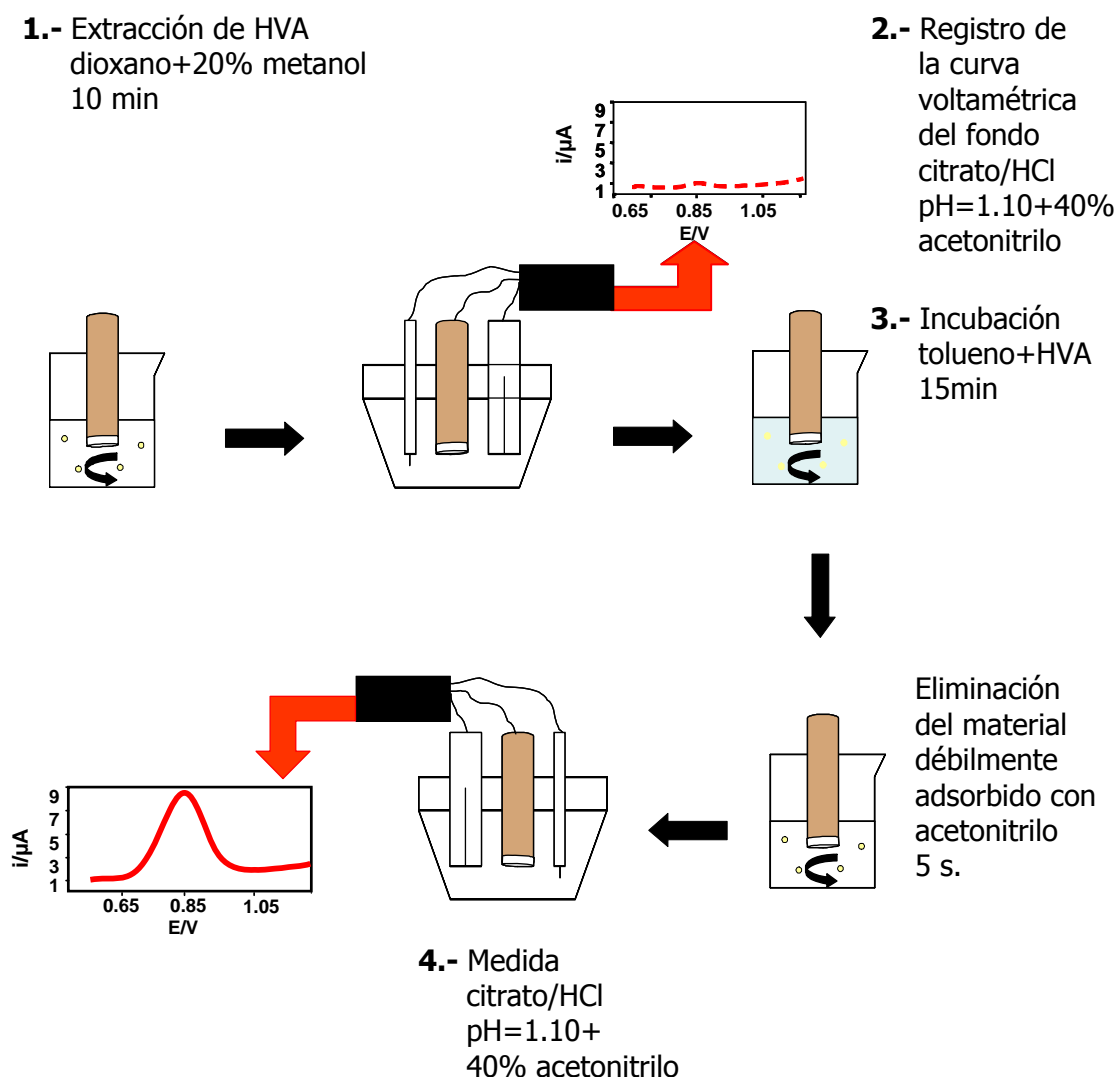


Figura 5.2.- Secuencia de etapas de medida para un electrodo modificado con una película de polímero.

La optimización de los tiempos de duración de las distintas etapas se describe en la sección 7.3.1 de este trabajo.

5.3.5.- Preparación de las muestras de orina

La orina procedente de voluntarios sanos fue en realidad una mezcla de orinas suministradas de forma anónima por nueve personas, entre familiares y amigos que colaboraron de forma altruista en este estudio. El resto de muestras utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Hospital Central de Asturias, de entre sus pacientes. El procedimiento de tratamiento de muestras se detalla a continuación.

A. Extracción líquido-líquido para la eliminación de interferentes

El procedimiento de extracción que se empleó es el que describen en la bibliografía Knight y Haymond¹²⁷. Se adicionaron a un embudo de extracción 2 mL de orina, 1 g de cloruro sódico, 500 µl de ácido clorhídrico 6 M y 2.5 mL de agua Milli-Q. La mezcla se agitó vigorosamente hasta la completa disolución de la sal y se añadieron 10 mL de cloroformo. Se realizaron tres extracciones sucesivas con 10 minutos de agitación. El extracto se evaporó a sequedad a una temperatura de 60°C en un termostato de bloque metálico bajo nitrógeno, y se redisolvió en 1 mL de tolueno realizándose la incubación del sensor directamente en este extracto siguiendo el protocolo de medida anterior.

B. Eliminación de interferentes mediante cartuchos de extracción en fase sólida (C18)

Se aplicó un procedimiento de extracción comercial para el análisis de catecolaminas en orina (Strata SPE[®] Phenomenex). Para ello se empleó un cartucho de extracción C18 de 500 mg, (Teknokroma, Barcelona, España). Se acondicionó tres veces sucesivas con 1 mL de metanol y 1 mL de cloruro amónico 0.1 M. Finalmente, se adicionó 1 mL

de muestra diluida al 50% con cloruro amónico 0.1 M hasta pH=8.1 (se ajustó el pH con KOH concentrado). A continuación se lavó tres veces sucesivas con 2 mL de agua desionizada y se eluyó con 2.5 mL de metanol/HCl 0.1 M 30:70 v/v. La fracción eluida se evaporó a sequedad a una temperatura de 60°C bajo nitrógeno, y se reconstituyó en 1 mL de tolueno realizándose la incubación del sensor directamente en este extracto.

C. Eliminación de interferentes mediante cartuchos de extracción en fase sólida con un intercambiador aniónico fuerte (SAX)

El procedimiento de extracción empleado es un método comercial para la extracción conjunta de VMA, 3, 4-dihidroxifenilacético (DOPAC), IAA y HVA en orina (Isolute[®], Argonaut[®]). Se utilizó un cartucho SAX de 500 mg (Teknokroma, Barcelona, España) acondicionado previamente tres veces sucesivas con 0.6 mL de metanol y 1.5 mL de una disolución de cloruro amónico 0.1 M de pH=8.5 (se ajustó el pH con KOH concentrado). A continuación se adicionó 1 mL de muestra diluida al 50% con cloruro amónico 0.1 M hasta pH=8.1 (se ajustó el pH con KOH concentrado). Se lavó haciendo pasar por el cartucho 1 mL de metanol/agua 10:90 v/v tres veces sucesivas, y se eluyó con 1.5 mL de una mezcla metanol/ácido ortofosfórico 0.1 M 30:70 v/v. La fracción eluida se evaporó a sequedad bajo nitrógeno a 60°C y se reconstituyó en 1 mL de tolueno, realizándose la incubación del electrodo de forma directa en este extracto.

Capítulo 6

Evaluación de la capacidad de enlace del MIP mediante ensayos de unión

6.1.- Antecedentes

6.1.1.- Métodos de evaluación de la afinidad.

Los polímeros molecularmente impresos (MIPs) constituyen un nuevo tipo de materiales adsorbentes selectivos. Por esta razón, la principal aplicación analítica de los MIPs ha sido en el campo de las separaciones analíticas, concretamente en cromatografía líquida¹²⁸⁻¹³⁴, electroforesis capilar¹³⁵⁻¹³⁹, extracción en fase sólida¹⁴⁰⁻¹⁵⁰ y en membranas molecularmente impresas¹⁵¹⁻¹⁶³.

Además, otras tendencias de investigación actuales buscan usar los MIPs como sustitutos de anticuerpos en biosensores¹⁶⁴⁻¹⁷⁰ o en ensayos de unión análogos a los inmunoensayos¹⁷¹⁻¹⁷⁷.

Puesto que uno de los principales objetivos de este trabajo es validar los resultados teóricos obtenidos en el diseño de MIPs, es necesario seleccionar una herramienta analítica que permita evaluar las características de enlace del MIP en términos de constantes de afinidad y número de sitios de unión disponibles.

En este sentido, los ensayos de unión proporcionan información que permite abordar el problema anteriormente planteado de forma sencilla y eficaz, a través del ajuste de los datos experimentales a diversos modelos matemáticos (isotermas de adsorción). Una gran parte de los métodos descritos en la bibliografía para la evaluación de las características de enlace de los MIPs emplean esta metodología¹⁷⁸⁻¹⁹⁰. Una isoterma de adsorción mide la eficacia del enlace de un polímero en un intervalo de concentraciones del analito. Habitualmente se utilizan representaciones de la concentración de analito enlazado al polímero (B) frente a la concentración de analito no enlazado o libre en la disolución sobrenadante (F).

Las isotermas de enlace para los MIPs se pueden obtener a partir de estudios de reenlace con ensayos de unión en discontinuo, donde una cantidad constante de polímero se reequilibra con una concentración de analito fija y conocida¹⁹¹⁻¹⁹³. La concentración de analito libre en la disolución (F) puede medirse mediante espectroscopia UV, fluorescencia, HPLC con distintos tipos de detección, ensayos con ligandos radiactivos y en general cualquier técnica analítica que proporcione suficiente sensibilidad. Sin embargo, no es frecuente en la bibliografía el uso de voltametría para esta medida en ensayos con MIPs. La concentración de analito enlazado (B) se calcula como la diferencia entre la concentración de analito total (T) y la concentración libre ($B=T-F$). Las isotermas también pueden obtenerse directamente empleando estudios cromatográficos¹⁹⁴, donde los MIPs se emplean como fase estacionaria en columnas cromatográficas.

La capacidad de enlace relativa de dos polímeros puede determinarse de forma cualitativa superponiendo sus respectivas isothermas, aunque también es posible realizar su cuantificación comparando algunos parámetros de enlace, como son el número de sitios de unión (N) y la constante de afinidad o de asociación (K), que pueden calcularse a partir de las isothermas. Este cálculo requiere la aplicación de un modelo de enlace específico. Algunos modelos de isothermas que se han aplicado a los MIPs son: Langmuir, bi-Langmuir, Freundlich, Toth y Langmuir-Freundlich^{178-190, 195-197}. Cada modelo determina una relación matemática entre las concentraciones de analito enlazado (B) y libre (F), además de realizar determinadas hipótesis al considerar la distribución de sitios de unión.

Desafortunadamente, los métodos que emplean aproximaciones numéricas para generar estas distribuciones son computacionalmente muy complejos y sensibles al error experimental, necesitándose gran número de datos experimentales de la isoterma. Este hecho hace que estos métodos no se utilicen de forma generalizada para caracterizar los MIPs. Una posible solución es asumir que las distribuciones de sitios de unión se ajustan a una determinada forma o modelo, tal como se explica a continuación.

6.1.2.- Modelos de enlace

Los modelos de enlace pueden agruparse en dos clases: modelos de distribución discretos y continuos. Los modelos de enlace más utilizados, las isothermas de Langmuir y bi-Langmuir, son ejemplos de modelos de enlace discretos. Estos modelos reducen la distribución a un número finito de clases diferentes de sitios, cada clase con distinta afinidad. El modelo de Langmuir considera que hay un sólo tipo de clase de sitios, y el modelo bi-Langmuir asume que sólo hay dos tipos de clases de sitios.

Las isothermas de Freundlich y Langmuir-Freundlich son ejemplos de modelos de distribución continuos en el que una función continua contiene un número infinito de tipos diferentes de sitios de unión. La figura 6.1 muestra los modelos de distribución de sitios de unión discretos y continuos.

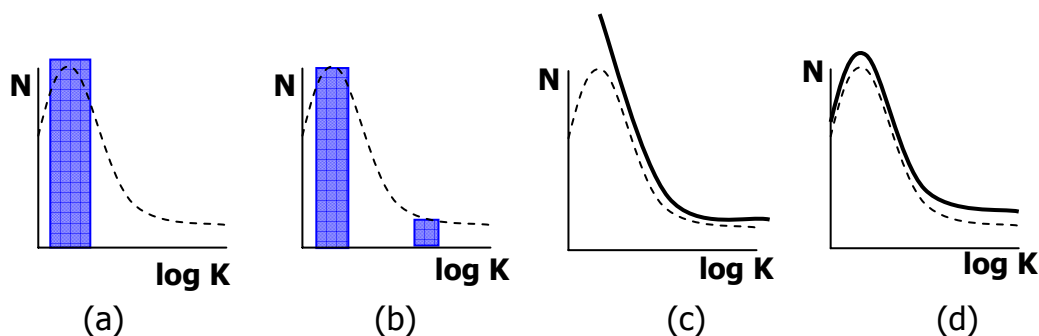


Figura 6.1.- Modelos de distribución de sitios de unión discretos (a y b) y continuos (c y d), que se muestran como barras y líneas sólidas respectivamente. Se superponen a la distribución heterogénea global propuesta para los MIPs¹⁹⁸ (línea discontinua). (a) Langmuir (unimodal estrecha); (b) bi-Langmuir (bimodal); (c) Freundlich (exponencial); Langmuir-Freundlich (unimodal amplia).

La distribución de sitios de unión o distribución de afinidad (DA), representa el número de sitios de unión (N) que tienen una determinada constante de afinidad (K). De forma general, los MIPs parecen contener una distribución unimodal de sitios de unión con dos regiones características¹⁹⁸: un pico unimodal de baja afinidad y una región asintótica decreciente de alta afinidad (figura 6.2). El pico unimodal corresponde a la zona de la isoterma en la que el polímero alcanza la saturación. Sin embargo, en la mayor parte de aplicaciones analíticas se trabaja en la zona de subsaturación correspondiente a la región exponencial decreciente. Esta región se corresponde con la porción lineal de la isoterma cuando se ajustan los datos al formato $\log B$ vs. $\log F$.

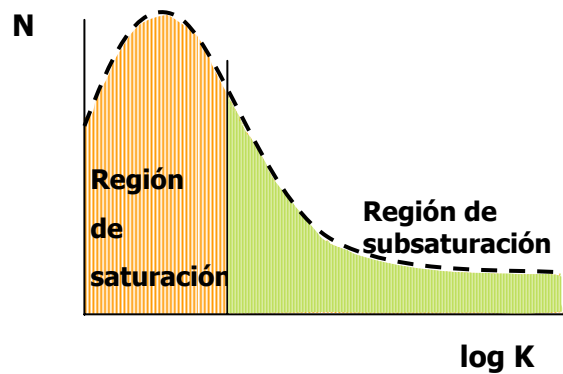


Figura 6.2.- Modelo de distribución de afinidad propuesto para los MIPs¹⁹⁸.

6.1.2.1.- Modelos de enlace discretos

Los modelos de Langmuir y bi-Langmuir cuyas ecuaciones [6.1] y [6.2] se presentan a continuación, son los más sencillos de tratar matemáticamente debido a que permiten obtener de forma inmediata parámetros de enlace como la constante de afinidad (K) y el número de sitios de unión (N) a partir de la denominada curva de Scatchard.

$$\text{Langmuir} \quad B = \frac{N_t a F}{1 + a F} \quad \text{donde } a = K_0 \quad [6.1]$$

$$\text{Bi-Langmuir} \quad B = \frac{N_1 K_1 F}{1 + K_1 F} + \frac{N_2 K_2 F}{1 + K_2 F} \quad [6.2]$$

En la representación de Scatchard, la isoterma de enlace experimental se ajusta al formato B/F vs. B . En sistemas homogéneos que contienen sólo un tipo de sitios de unión (Langmuir), del ajuste anterior se obtiene una línea recta con pendiente igual a la constante de afinidad promedio en negativo ($-K_0$) y una ordenada en el origen relacionada con el número total de sitios de unión (N_t):

$$B/F = K_0 N_t - K_0 B \quad [6.3]$$

Esta representación para la mayoría de los MIPs no es lineal, sino curva, hecho que pone en evidencia la heterogeneidad de los sitios de unión¹⁹³. Sin embargo, en este caso también es posible obtener las constantes de afinidad y número de sitios de unión para dos clases de sitios (K_1, N_1 y K_2, N_2) ajustando la curva a dos líneas rectas (figura 6.3, modelo bi-Langmuir).

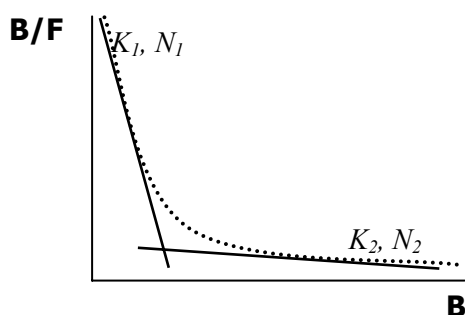


Figura 6.3.- Representación de Scatchard para el modelo bi-Langmuir. K_1 y N_1 representan los sitios de mayor afinidad y K_2 y N_2 los de menor afinidad.

Los modelos de Langmuir y bi-Langmuir se basan en la hipótesis de que los MIPs son relativamente homogéneos y contienen sólo uno o dos tipos de sitios de unión. Constituyen un modelo simplificado que puede tener cierto grado de validez en algún caso. Sin embargo, en general, la medida de las distribuciones de sitios de unión para los MIPs revela un amplio intervalo de constantes de afinidad¹⁹⁸.

6.1.2.2.- Modelos de enlace continuos

Los modelos de enlace continuos consideran al MIP, a diferencia de los modelos discretos, como un sistema heterogéneo, con sitios de unión de afinidad y selectividad variable. Estos modelos son más realistas y permiten explicar hechos experimentales relacionados con la heterogeneidad, como puede ser el amplio rango de constantes de

afinidad calculadas¹⁹⁸, la anchura de picos cromatográficos¹⁹⁹ o la baja selectividad de los MIPs²⁰⁰.

Los modelos de distribución continua como Freundlich y Langmuir-Freundlich se han aplicado recientemente a los MIPs¹⁷⁸⁻¹⁸⁴. Estos modelos permiten, en teoría, aproximaciones a la distribución unimodal propuesta para los MIPs, además de poder medir de forma cuantitativa la distribución de sitios de unión y la heterogeneidad.

A. Isoterma de Freundlich

El modelo más simple de distribución continua es la isoterma de Freundlich (IF) basado en la ecuación [6.4].

$$B = aF^m \quad [6.4]$$

Donde B y F son las concentraciones de analito enlazado y libre respectivamente, y a y m son dos parámetros de ajuste que tienen significado físico. El factor preexponencial, a , es una medida del número de sitios de unión (N_t) y la constante promedio de afinidad (K_D). El segundo parámetro de ajuste, m , se conoce como índice de heterogeneidad y su valor varía de 0 a 1, siendo el sistema más homogéneo a medida que se aproxima a 1.

La IF se aplica fácilmente mediante el ajuste de los datos experimentales al formato logarítmico. Las isotermas que cumplen la IF se ajustan a una línea recta:

$$\log B = m \log F + \log a \quad [6.5]$$

con pendiente m y ordenada en el origen $\log a$. El ajuste lineal supone una importante ventaja porque para definirse requiere menos datos experimentales que una función curvilínea.

Las propiedades de enlace del MIP utilizado en ensayos de unión pueden calcularse a partir de la isoterma de adsorción asumiendo un modelo específico. En el caso de los modelos homogéneos, los parámetros de enlace se extraen de forma directa. Sin embargo, los modelos heterogéneos requieren la solución de la integral de Langmuir (ecuación [6.6])²⁰¹, que no tiene solución analítica, por lo que se han desarrollado métodos aproximados para su resolución.

$$B = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{N(K)FK}{1 + FK} d(\log K) \quad [6.6]$$

Uno de estos métodos aproximados es el método de Hunston²⁰² que calcula la distribución de afinidad (DA) de las isotermas de adsorción usando una diferencia finita de segundo orden para resolver la integral:

$$N(K) = \frac{B(\alpha F) - B(F/\alpha)}{2 \log \alpha} - \frac{\alpha}{(\alpha - 1)^2} \frac{B(\alpha^2 F) - B(F/\alpha^2) - 2[B(\alpha F) - B(F/\alpha)]}{2 \log \alpha} \Big|_{F=K^{-1}} \quad [6.7]$$

La ecuación [6.7], también denominada ecuación del espectro de afinidad, permite calcular el número de sitios de unión N que poseen una determinada constante de afinidad K usando los valores de B interpolados de la isoterma experimental. La exactitud de la aproximación mejora a medida que α se aproxima a 1; valores alejados de 1 conducen a resultados no convergentes. Para evitarlo, se toma el límite de la ecuación anterior a medida que α se aproxima a 1^a.

La ecuación de la IF [6.5] se introduce en la ecuación [6.7] y tomando el límite, se obtiene la DA para la IF (ecuación [6.8]). Los parámetros a y m son los mismos que en la ecuación [6.4]. Las unidades de N son las mismas que las de B en la isoterma de adsorción,

^a Típicamente, $\log \alpha$ toma un valor de 0.2²⁰².

habitualmente [$\mu\text{mol/g}$]; F tiene unidades de [mmol/L], a , de [$(\mu\text{mol/g})$ ($\text{mmol/L})^{-m}$], y m es adimensional.

La ecuación se muestra a continuación:

$$N(K) = 2.303am(1-m^2)e^{-2.303m \log K} \quad [6.8]$$

La DA calculada a través de la ecuación [6.8] es válida en un rango de afinidades (K_{min} y K_{max}) que están determinadas por los límites de concentración libre (F_{max} y F_{min}) definidas por las ecuaciones [6.9] y [6.10]:

$$K_{min} = 1/F_{max} \quad [6.9]$$

$$K_{max} = 1/F_{min} \quad [6.10]$$

El número de sitios de unión promedio N_{k1-k2} y la constante de afinidad promedio K_{k1-k2} se calculan a partir de [6.11] y [6.12]^b.

$$N_{k1-k2} = a(1-m^2)(K_1^{-m} - K_2^{-m}) \quad [6.11]$$

$$K_{k1-k2} = \left(\frac{m}{m-1} \right) \left(\frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}} \right) \quad [6.12]$$

Los valores para estos parámetros se determinan para cualquier rango de constantes de afinidad K_1-K_2 dentro de los límites $K_{min}-K_{max}$.

Una importante limitación de la IF es que sólo es exacta para la región intermedia de la isoterma completa. Se observan discrepancias del modelo tanto a concentraciones muy elevadas (región de saturación)

^b La ecuación [6.11] deriva de la integración de la ecuación [6.8] con respecto a K sobre los límites de K_1 a K_2 . La ecuación [6.12] deriva de la integral del producto de K y $N(K)$ (ecuación [6.8]) dividida por la ecuación [6.11]¹⁸².

como a concentraciones muy bajas. Afortunadamente, las isothermas de enlace para la mayor parte de los MIPs se ajustan a un intervalo de concentración intermedia donde la IF es aplicable. La región de saturación no es observable para la mayoría de los MIPs debido a la heterogeneidad de los mismos, y la misma se alcanza a concentraciones extremadamente elevadas, superiores al rango mM. De igual forma, el extremo de concentraciones más bajo (<nM) es difícil de medir debido al posible sangrado de la molécula molde.

B. Isotherma de Langmuir-Freundlich

La incapacidad de la IF para modelizar la región de saturación limita los tipos de parámetros de enlace que pueden calcularse a partir de ella. Así, a partir de la IF no puede determinarse el número total de sitios de unión (N_t) o la constante de afinidad promedio (K_0). Para calcular estos parámetros es necesario desarrollar modelos híbridos que puedan modelizar las regiones de saturación y subsaturación al mismo tiempo en la misma isoterma como son los modelos de Jovanovic-Freundlich¹⁸⁵ o Langmuir-Freundlich¹⁷⁸. La isoterma de Langmuir-Freundlich (ILF) (ecuación [6.13]) es una función que describe la relación entre la concentración de analito enlazado (B) y libre (F) en el equilibrio a través de tres parámetros de ajuste con significado físico: N_t , a y m . N_t es el número total de sitios de unión. La variable a se relaciona con la constante de afinidad promedio (K_0) a través de la relación $K_0 = a^{1/m}$. Por último, m tiene el mismo significado que el índice de heterogeneidad para IF.

La ecuación a considerar es la que se detalla a continuación:

$$B = \frac{N_t a F^m}{1 + a F^m} \quad \text{donde } a = (K_0)^{1/m} \quad [6.13]$$

La ILF es un modelo híbrido entre las isothermas de Langmuir y Freundlich y puede reducirse a cualquiera de las anteriores en el límite. Cuando $m=1$, la isoterma de Langmuir-Freundlich se reduce a la isoterma de Langmuir [6.1], donde a se corresponde directamente a la constante de afinidad (K). Si F o a se aproxima a 0, es decir, $aF^m \ll 1$, la ILF se reduce a la isoterma de Freundlich.

De forma análoga al cálculo de la distribución de afinidad para la isoterma de Freundlich, se introduce [6.13] en la ecuación del espectro de afinidad [6.7] para obtener la siguiente expresión¹⁷⁸:

$$N(K) = N_i a m (1/K_i)^m \times \frac{(1 + 2a(1/K_i)^m + a^2(1/K_i)^{2m} + 4a(1/K_i)^m m^2 - a^2(1/K_i)^{2m} m^2 - m^2)}{(1 + a(1/K_i)^m)^4} \quad [6.14]$$

Esta ecuación calcula el número de sitios de unión (N_i) con una determinada constante de afinidad (K_i) empleando los parámetros de ajuste experimentales de la isoterma de Langmuir-Freundlich (a , m y N_i). La distribución de afinidad calculada a través de la ecuación anterior es válida en un rango de afinidades (K_{min} y K_{max}) que están determinadas por los límites de concentración libre (F_{max} y F_{min}) definidas por las mismas expresiones empleadas en la isoterma de Freundlich (ecuaciones [6.9] y [6.10]).

En general, la isoterma de Langmuir-Freundlich tiene una aplicabilidad más general en la caracterización de los MIPs debido a que puede modelizar las regiones de subsaturación y saturación de forma conjunta. Sin embargo, la ILF habitualmente no es necesaria debido a que las isothermas para la mayor parte de los MIPs se miden en la región de subsaturación donde es suficiente con aplicar la IF.

6.2.- Detección voltamétrica de ácido homovanílico con electrodos de pasta de carbono

La caracterización del comportamiento electroquímico del HVA sobre electrodos de pasta de carbono se realizó utilizando como técnica de trabajo la voltamperometría cíclica con una velocidad de variación de potencial de 50 mV/s. En la figura 6.4 se muestra el voltamperograma cíclico obtenido a una concentración de HVA de 2×10^{-4} M en citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10. El barrido lineal de potencial se llevó a cabo entre -0.250 y 1.200 V con vuelta al potencial inicial y a una velocidad de barrido de potenciales de 50mV/s.

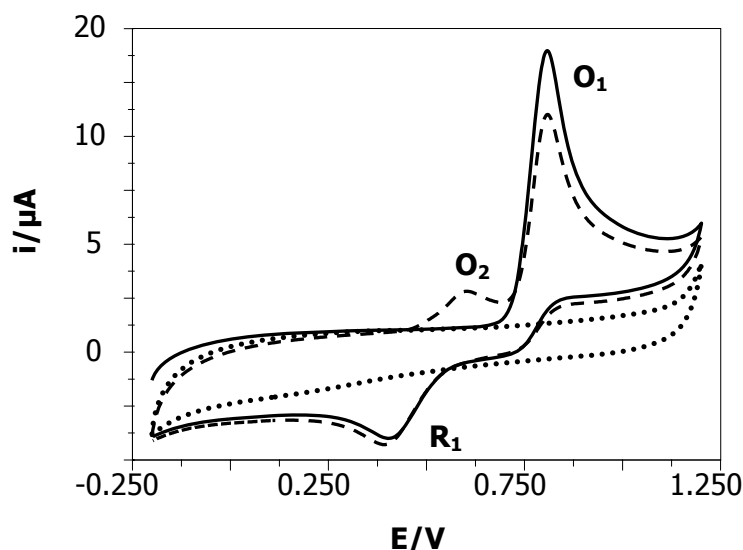


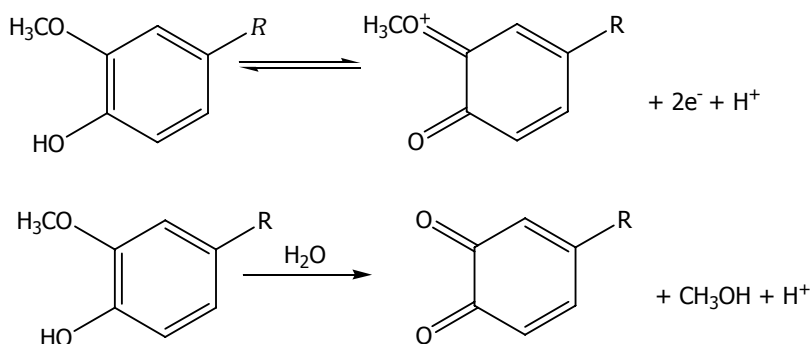
Figura 6.4.- Voltamperograma cíclico obtenido a una concentración de HVA de 2×10^{-4} M en citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10 para un electrodo de pasta de carbono. Fondo (trazo de puntos), primer barrido de potencial (trazo continuo) y segundo barrido sucesivo (trazo discontinuo).

Se observa un proceso de oxidación irreversible en el primer barrido (O_1) con un potencial de pico de 0.808 V y en el barrido de vuelta un proceso de reducción (R_1) con un potencial de pico de 0.403 V. En el segundo barrido de potencial aparece un segundo pico de oxidación O_2 a

un potencial de 0.599 V, debido a un producto de oxidación del HVA, que forma un par cuasi-reversible con el proceso R_1 .

Este comportamiento se corresponde con un mecanismo de oxidación ECE (Electroquímico-Químico-Electroquímico), donde una reacción química acoplada da lugar a productos responsables del proceso electroquímico R_1/O_2 . El mecanismo de la reacción de oxidación de distintos metoxifenoles sustituidos se ha descrito en la bibliografía para electrodos de pasta de carbono^{203, 204}.

El mecanismo propuesto para la oxidación en disolución ácida involucra dos electrones a través de una reacción química rápida con agua para eliminar un mol de metanol y formar la quinona correspondiente (esquema 1).



Esquema 1. Mecanismo de oxidación de metoxifenoles sustituidos.

Se realizó un estudio de la influencia del pH sobre el potencial y las corrientes de pico de dicho sistema redox para una concentración de HVA de 2×10^{-4} M. Se pudo observar que a medida que aumenta el pH, el potencial de oxidación del pico principal, O_1 , se desplaza hacia potenciales menores, hasta alcanzar un valor que se mantiene estable a pH superior a 10. Para fijar los valores de pH del medio en todo el intervalo, se emplearon disoluciones reguladoras de: citrato/HCl 0.1 M para el intervalo de 1.1 a 4.9, acetato/fosfato 0.1 M para el intervalo de 6 a 11 e hidróxido sódico 0.1 M para pH superiores a 11.

Los datos experimentales se ajustan a la ecuación que se muestra a continuación, en el intervalo de pH 1.10 a 10.99, tal como se deduce de la representación gráfica de la figura 6.5.

$$\text{pH} = -0.051 E / V + 0.868$$

$$r = 0.998$$

$$n = 8$$

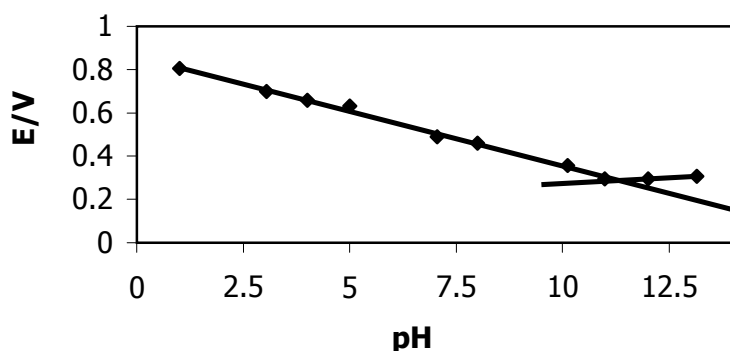


Figura 6.5. (Tablas, T-1).- Variación del potencial de pico para el proceso anódico principal O_1 con el pH. Las medidas se realizaron mediante voltametría cíclica a una concentración de HVA de 2×10^{-4} M.

También se evaluó la influencia del pH en la intensidad de pico de oxidación, obteniéndose una disminución de la intensidad de corriente a medida que aumenta el pH (figura 6.6).

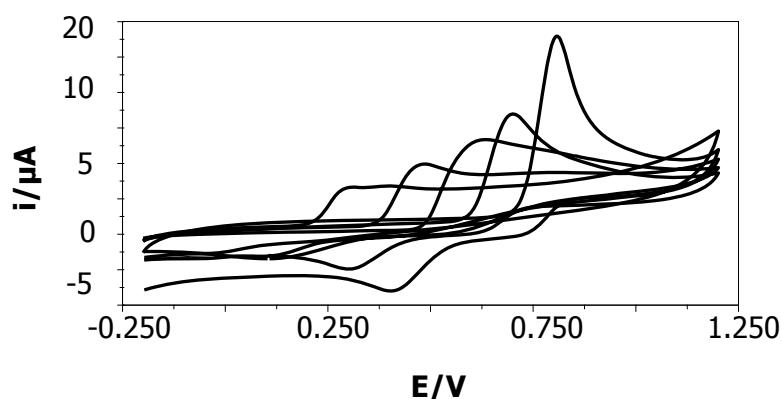


Figura 6.6. (Tablas, T-2).- Variación de la intensidad de corriente del proceso anódico principal O_1 con el pH. Las medidas se realizaron mediante voltametría cíclica a una concentración de HVA de 2×10^{-4} M para valores de pH de izquierda a derecha: 13.14, 7.05, 4.90, 3.05 y 1.10.

A la vista de la figura 6.6, el pH óptimo de medida del HVA se fijó a un valor de 1.10 con una disolución reguladora de citrato/HCl 0.1 M, puesto que es el medio al que se obtiene una mayor sensibilidad en la señal.

Por último, para este proceso se estudió también la influencia de la velocidad de barrido de potenciales sobre las corrientes de pico a tres niveles de concentración de HVA: 5×10^{-6} M, 5×10^{-5} M y 2×10^{-4} M (Tablas, T-3). Para ello, se llevó a cabo un barrido de potencial entre -0.250 V y $+1.200$ V con vuelta al potencial inicial y con velocidades de barrido entre 5 y 1000 mV/s.

Los datos experimentales se ajustan a las ecuaciones que se muestran a continuación:

$$i/nA = 65.1 v^{1/2} / (mV/s)^{1/2} - 63.0 \quad r=0.997 \quad n=5 \quad [HVA]=5 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$i/nA = 339.6 v^{1/2} / (mV/s)^{1/2} - 455.9 \quad r=0.997 \quad n=7 \quad [HVA]=5 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$i/nA = 1999.7 v^{1/2} / (mV/s)^{1/2} - 4017.0 \quad r=0.997 \quad n=6 \quad [HVA]=2 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Se observa una variación lineal de la intensidad de pico anódico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potenciales, lo que indica que el proceso de electrodo está controlado por la difusión de la especie electroactiva a la superficie electródica a los tres niveles de concentración ensayados.

Empleando la señal del pico de oxidación principal O_1 se desarrolló un método de análisis por voltametría diferencial de pulso. La gráfica de calibración se muestra a continuación (Figura 6.7, Tablas, T-4). Se obtuvo una respuesta lineal con la concentración de HVA en el intervalo de concentraciones de 1.0×10^{-7} a 5.0×10^{-4} M, con un límite de detección de 1.7×10^{-7} M. La ecuación de la recta de calibrado resultó ser:

$$i/\mu\text{A} = 53.584[\text{HVA}]/\text{mM} + 0.251 \quad r = 0.999 \quad n = 10$$

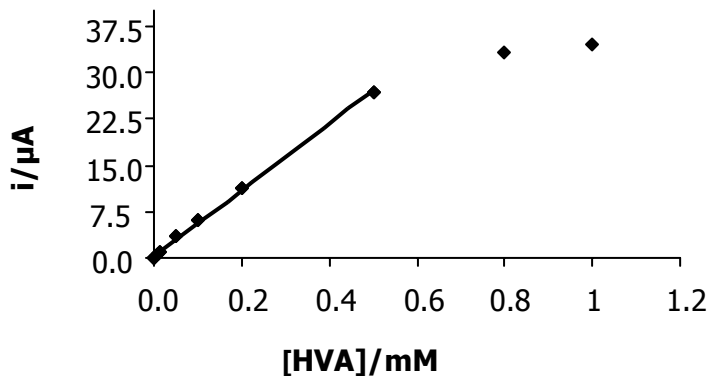


Figura 6.7. (Tablas, T-4).- Gráfica de calibración para HVA obtenida con un electrodo de pasta de carbono mediante voltametría diferencial de pulso en una reguladora de citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10.

6.3.- Selección de las condiciones de polimerización

Para confirmar experimentalmente la selección de monómero funcional y disolvente óptimo obtenidos mediante cálculos DFT se emplearon polímeros acrílicos sintetizados en pequeña escala, denominados mini-MIPs. Sus ventajas son, principalmente, el empleo de pequeñas cantidades de polímero (≈ 50 mg aproximadamente) y la supresión de las etapas de molienda y tamizado.

En la bibliografía se describen equipos automáticos capaces de evaluar en un tiempo reducido mini-MIPs diseñados mediante métodos quimiométricos en distintas condiciones²⁰⁵⁻²⁰⁸. En este trabajo, los polímeros se sintetizaron y evaluaron siguiendo un procedimiento manual y posteriormente se utilizaron para determinar rápidamente parámetros que afectan a la polimerización, como son la naturaleza del monómero

funcional y disolvente empleado, así como el tipo de polimerización fotoquímica/ térmica que se lleva a cabo.

6.3.1.- Selección del tipo de iniciador y procedimiento de polimerización

Existen estudios en la bibliografía que indican que el tipo de iniciación de la polimerización (térmica o fotoquímica) puede influir en el comportamiento final de los polímeros impresos²⁰⁹⁻²¹². Cuando la polimerización se realiza térmicamente, las cadenas se inician por varios puntos a la vez, por lo que se obtienen polímeros con un alto grado de entrecruzamiento. En el caso de la polimerización fotoquímica, este proceso se inicia por los puntos más superficiales, los más cercanos a la fuente de radiación y, por tanto, podría considerarse que existe una dirección preferente de iniciación de las cadenas, dando como resultado polímeros menos entrecruzados que en el caso anterior.

Para determinar la influencia del iniciador y el tipo de polimerización en las propiedades de reconocimiento del MIP, se realizaron ensayos de unión a partir de MIPs y NIPs sintetizados en diclorometano con tres monómeros funcionales: ácido 2-trifluorometacrílico (TFMAA), ácido metacrílico (MAA) y 2-metacrilamida (MA) en condiciones de polimerización térmica y fotoquímica. Para ello, se seleccionaron dos iniciadores: DPP que es un iniciador fotoquímico, y AIBN que es un iniciador empleado tanto en polimerización térmica como fotoquímica. El procedimiento para realizar los ensayos de unión se describió en el apartado 5.3.2.

Las medidas realizadas a partir de los líquidos de lavado parecen indicar que los polímeros sintetizados con el iniciador AIBN en condiciones térmicas se lavan peor en el disolvente de lavado que los polímeros sintetizados en condiciones fotoquímicas. Este hecho puede ser debido a que, efectivamente, se trate de polímeros más entrecruzados.

También se observa un efecto de sangrado, más acusado cuando se polimeriza térmicamente, lo que puede concordar con el mayor entrecruzamiento y rigidez de los polímeros térmicos.

Al comparar los resultados obtenidos con polímeros iniciados fotoquímicamente con AIBN y DPP no se observan diferencias apreciables en la capacidad de enlace, por lo que se optó en ensayos sucesivos por el empleo de DPP, puesto que es un fotoiniciador mucho más rápido y eficaz que el AIBN.

6.3.2.- Selección del disolvente porogénico

Para confirmar el disolvente de polimerización más favorable, se realizaron ensayos de unión a partir de polímeros sintetizados fotoquímicamente con DPP en tolueno y diclorometano para los tres monómeros ensayados.

En diclorometano se observan porcentajes de retención más bajos que para tolueno en los tres monómeros estudiados, hecho que confirma los resultados obtenidos mediante cálculos teóricos (apartados 4.2.6 y 4.2.7).

6.3.3.- Selección del monómero funcional

Cuando se realiza un ensayo similar al anterior seleccionando DPP como iniciador y tolueno como disolvente de polimerización para los tres monómeros funcionales ensayados, se obtuvo mayor retención del HVA en el MIP sintetizado con TFMAA, seguido de MAA y MA. Esta tendencia observada experimentalmente se corresponde exactamente con las predicciones teóricas (apartado 4.2.6).

Para discriminar si el enlace al polímero es debido a contribuciones específicas o inespecíficas se realizó un ensayo en las mismas condiciones con un NIP sintetizado para cada monómero funcional. La unión específica

se evaluó a partir del cociente entre las relaciones B/T obtenidas para polímero impreso y polímero no impreso, donde B es una medida de la cantidad de HVA enlazada por el polímero. Cuando este cociente es ≤ 1 , se considera que el enlace no es específico. B se obtuvo por diferencia entre la concentración total de HVA adicionada (T) y la concentración de HVA determinada en el sobrenadante una vez que se ha alcanzado el equilibrio, F .

Los resultados obtenidos (Tabla 6.1) confirman que el TFMAA es el monómero funcional que conduce a un enlace específico del HVA ($(\%B/T_{MIP})/(\%B/T_{NIP})=2$) mientras que para MAA y MA, la adsorción es íntegramente inespecífica, siendo mayor la retención en el NIP que en el MIP.

Tabla 6.1.- Porcentajes de retención (B/T) para MIP y NIP y relación de porcentajes MIP/NIP para los tres monómeros ensayados: TFMAA, MAA y MA.

	(%B/T)/Tolueno		
	MIP	NIP	MIP/NIP
TFMAA	60	40	2
MAA	25	63	<1
MA	10	89	<1

6.4.- Caracterización del proceso de impresión molecular mediante isothermas de adsorción

Una vez realizada una comprobación experimental o "cribado" para confirmar que la selección del monómero y disolvente predichos con los cálculos DFT son los más adecuados, se investigaron las características de enlace del polímero sintetizado con TFMAA y tolueno mediante isothermas de adsorción.

Los estudios realizados y los resultados obtenidos se detallan a continuación.

6.4.1.- Selección de la concentración de polímero

Después de sintetizar, tamizar y lavar el polímero (sección 5.3.3), se utilizó la fracción inferior a 25 μm para realizar un ensayo que permita determinar la concentración de polímero necesaria para observar aproximadamente un 50% de analito enlazado.

Este ensayo, además de fijar la cantidad de polímero adecuada para próximos ensayos de unión, permite obtener una visión de la capacidad de retención del polímero. En este estudio, se varía la concentración de MIP y NIP (sintetizado con TFMAA y tolueno) desde 0.5 hasta 121.1 mg/mL manteniendo la concentración de HVA fija a 1×10^{-4} M. Los resultados se muestran en la figura 6.8.

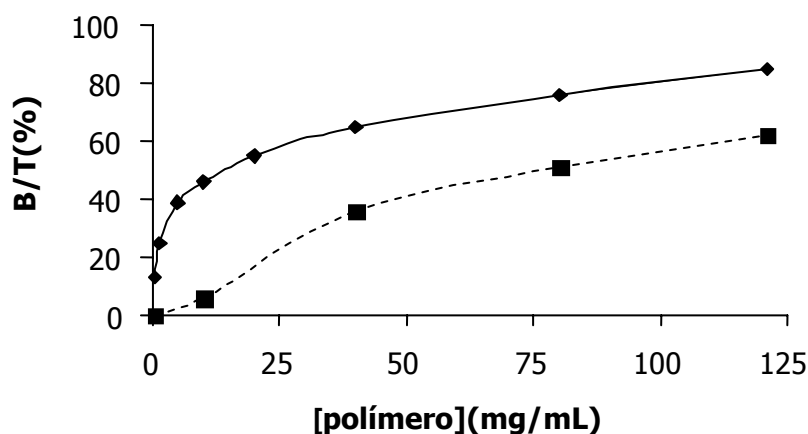


Figura 6.8. (Tablas, T-5).- Representación del porcentaje de enlace (B/T) en función de la concentración de polímero para MIP (línea continua) y NIP (línea discontinua) sintetizados e incubados en tolueno, a una concentración constante de HVA de 1×10^{-4} M.

A la vista de los resultados, la concentración de MIP para la que se alcanza aproximadamente un 50% de enlace del HVA es de 10 mg/mL y es la que se empleará en lo sucesivo.

Si se compara la curva de enlace para el MIP y el NIP se observa que el MIP retiene más ácido homovanílico que el NIP en todo el rango de concentraciones estudiadas, y en particular, a concentraciones bajas las diferencias de retención entre el MIP y el NIP se acentúan. Para la concentración de polímero de 10 mg/mL, el porcentaje de enlace para el MIP es de 46% mientras que para el NIP es de apenas un 6%. Por lo tanto se puede decir que la retención del ácido homovanílico en el MIP es fundamentalmente específica, es decir, se debe a la existencia de sitios de unión específicos.

6.4.2.- Estudio de la influencia del disolvente porogénico

Según los cálculos DFT, el disolvente óptimo tanto para imprimir la molécula molde como para reenlazarla es el tolueno. De forma experimental se pretende corroborar este hecho realizando un ensayo de unión para un MIP con TFMAA sintetizado e incubado en tolueno y un MIP sintetizado e incubado en acetonitrilo, un disolvente teóricamente más desfavorable (ver figura 6.9, Tablas, T-6).

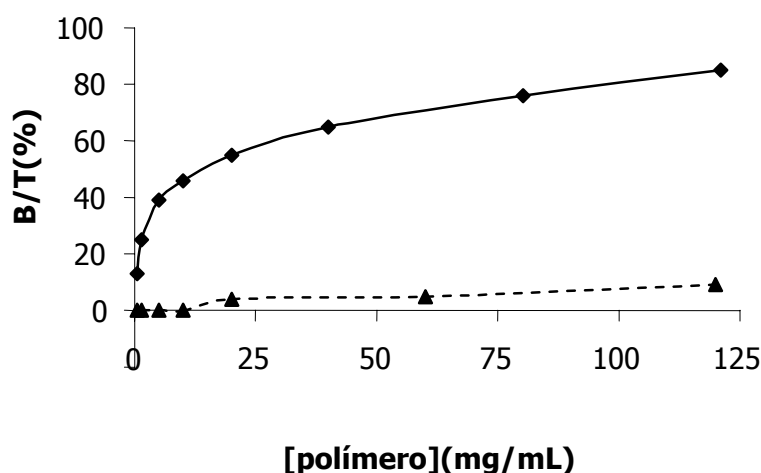


Figura 6.9. (Tablas, T-6).- Representación del porcentaje de enlace (B/T) en función de la concentración de polímero para un MIP sintetizado e incubado en tolueno (línea continua) y un MIP sintetizado e incubado en acetonitrilo (línea discontinua) a una concentración constante de HVA de 1×10^{-4} M.

Se puede observar que cuando se realiza la incubación en acetonitrilo con el MIP sintetizado en el mismo disolvente, los porcentajes de enlace disminuyen drásticamente en todo el intervalo de concentraciones ensayadas. Por tanto, parece ser que la sustitución del tolueno por acetonitrilo como disolvente porogénico modifica drásticamente las propiedades de reconocimiento del MIP. Este hecho experimental concuerda con los resultados predichos mediante el cálculo de las energías de enlace del aducto de prepolimerización en dichos disolventes.

6.4.3.- Estudio de la influencia del disolvente de incubación

En el ensayo anterior, el MIP sintetizado e incubado en acetonitrilo conduce a porcentajes de retención drásticamente más bajos que los del tolueno (figura 6.9). Este estudio permite confirmar que el acetonitrilo es

un mal disolvente porogénico, es decir, genera complejos de prepolimerización monómero-molécula molde poco favorables, hecho que confirma las predicciones realizadas con los cálculos DFT (apartados 4.2.6 y 4.2.7).

Pero además, es posible evaluar al acetonitrilo como disolvente de incubación para un MIP sintetizado en tolueno. Para ello, se llevó a cabo un ensayo en el que se fijó la concentración de MIP en 10 mg/mL y la concentración de HVA en 1×10^{-4} M. El resultado es concluyente: no se observa apenas retención del HVA en dicho disolvente ($B/T=4.5\%$) por lo que se confirma nuevamente que no sólo el acetonitrilo es un mal disolvente porogénico para generar cavidades de unión específicas en el proceso de impresión molecular sino que además es un mal disolvente de incubación para un polímero supuestamente "óptimo", confirmándose nuevamente los cálculos teóricos.

6.4.4.- Ensayos de unión

Para una concentración de polímero fija de 10 mg/mL determinada con anterioridad, se realizó un ensayo de reenlace con diferentes concentraciones de patrón de HVA en tolueno, desde 2.6×10^{-7} a 5.1×10^{-4} M. La concentración del analito que permanece en el equilibrio libre en disolución, F , se midió mediante voltametría diferencial de pulso. Previamente a la medida voltamétrica es necesario incorporar una etapa intermedia donde se evapora el sobrenadante a sequedad y se reconstituye con la reguladora de medida citrato/HCl 0.1 M pH=1.10. Esta etapa es necesaria debido a la inmiscibilidad de los disolventes orgánicos empleados con la fase acuosa donde se desarrolla la medida.

Una vez que se miden B y F se ajustan los datos a los tres modelos propuestos: Langmuir (IL), Langmuir-Freundlich (ILF) y Freundlich (IF). (sección 6.1.2.2). Inicialmente los datos experimentales se ajustan bien al formato logarítmico $\log B$ vs. $\log F$. Los parámetros de ajuste a , m y Nt se calculan empleando la función *Solver* de Microsoft Excel 2003, minimizando el coeficiente de determinación R^2 a 1 y variando los coeficientes de ajuste. Los residuales correspondientes empleados para calcular el coeficiente de determinación se calcularon como $(\log B_{exp} - \log B_{calc})$, donde B_{exp} es la fracción de analito enlazada medida experimentalmente y B_{calc} es la fracción calculada según el modelo propuesto a partir de las fracciones libres medidas experimentalmente. Se requiere un ajuste logarítmico de los datos obtenidos debido a la amplitud del intervalo de concentraciones utilizadas en la isoterma de adsorción, que daría mayor peso estadístico a los puntos de mayor concentración¹⁹⁵.

Tal como se describía en el apartado 6.1.2.2.B, la ILF sería aplicable en el caso de que los datos experimentales cubrieran tanto la región de subsaturación como sobresaturación del polímero. Si los datos experimentales se localizan en la zona de subsaturación el modelo que proporcionará un mejor ajuste será el de Freundlich, mientras que si se localizan en la zona de sobresaturación el modelo más adecuado será el de Langmuir. Si se realiza la representación $\log B$ vs. $\log F$ y se obtiene una línea recta para todo el rango de concentraciones estudiado, los datos se ajustarán a la IF. También se podría aplicar la ILF porque a concentraciones bajas ésta se transforma en la IF, es decir, para $aF^m \ll 1$. Así, mediante la representación $\log B$ vs. $\log F$ se obtiene la figura 6.10.

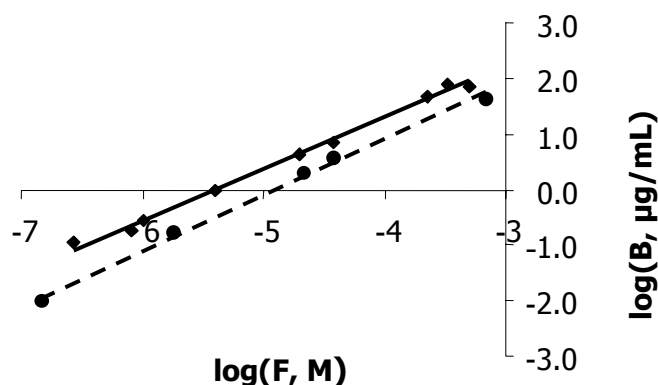


Figura 6.10. (Tablas, T-7).- Isoterma de adsorción experimental para MIP (línea continua) y NIP (línea discontinua). B representa la fracción de HVA enlazada al polímero y F la fracción libre o no enlazada.

Las ecuaciones del ajuste se recogen en tabla 6.2.

Tabla 6.2.- Ecuaciones de ajuste de MIP y NIP a la isoterma de Freundlich.

MIP	$\log B = 0.92 \log F + 4.97$	$R^2=0.995$	$n=9$
NIP	$\log B = 0.99 \log F + 4.88$	$R^2=0.993$	$n=5$

A la vista de los resultados, es posible ajustar los datos experimentales del MIP y el NIP directamente a la IF, aunque más adelante se discutirá el ajuste a otros modelos como la IL e ILF.

6.4.5.- Análisis de las isotermas de adsorción

El primer objetivo es examinar las diferencias entre polímero molecularmente impreso y no impreso empleando las tres isotermas estudiadas. La tabla 6.3 muestra los parámetros de ajuste para cada una de las tres isotermas estudiadas.

Tabla 6.3.- Parámetros de ajuste de MIP y NIP para las isothermas de adsorción de Langmuir, Langmuir-Freundlich y Freundlich.

Coefficientes de ajuste	MIP	NIP
LANGMUIR (IL)		
Nt	216.61 $\mu\text{mol/g}$	72.29 $\mu\text{mol/g}$
a	1192.35 M^{-1}	1192.68 M^{-1}
R²	0.993	0.992
LANGMUIR-FREUNDLICH (ILF)		
Nt	545.48 $\mu\text{mol/g}$	69.29 $\mu\text{mol/g}$
K_o	310.83 M^{-1}	2045.60 M^{-1}
Límites de la distribución de afinidad: $K_{min}-K_{max}=2000-3069000 \text{ M}^{-1}$		
a	220.28 M^{-1}	3764.32 M^{-1}
m	0.94	1.08
R²	0.995	0.998
FREUNDLICH (IF)		
N_{k1-k2}	13.02 $\mu\text{mol/g}$	0.84 $\mu\text{mol/g}$
K_{k1-k2}	20389.03 M^{-1}	15091.40 M^{-1}
Límites de la distribución de afinidad: $K_{min}-K_{max}=2000-3069000 \text{ M}^{-1}$		
a	94601.93 $(\mu\text{mol/g})(\text{M}^{-1})^m$	75787.92 $(\mu\text{mol/g})(\text{M}^{-1})^m$
m	0.92	0.99
R²	0.995	0.993

Los datos experimentales se ajustan relativamente bien a las tres isothermas propuestas, aunque las isothermas que mejor reproducen los resultados experimentales son la IF y la ILF a la vista de los coeficientes de determinación, como era previsible según lo comentado en la sección 6.1.2.

Las heterogeneidades de MIP y NIP están determinadas por el índice de heterogeneidad m . A medida que m se aproxima a 1, el polímero es más homogéneo. En este caso, tanto el MIP como el NIP tienen un valor de m de los más altos descritos en la bibliografía para MIPs no covalentes¹⁷⁸⁻¹⁸⁴. Esta es una característica deseable en los MIPs debido a que las heterogeneidades habitualmente limitan la capacidad de retención específica del polímero, dando lugar a polímeros de baja selectividad.

Cuando se comparan los índices de heterogeneidad para MIP y NIP en la IF e ILF se observa que los NIPs son más homogéneos que los MIPs, siendo ésta una tendencia general observada en otros trabajos publicados¹⁸².

6.4.6.- Distribuciones de afinidad (DA)

Como se comentó en el apartado 6.1.2.2, a partir de las ecuaciones [6.7] y [6.14] es posible calcular la distribución de afinidad tanto de la IF como de la ILF. Aunque la expresión para la DA teóricamente permite el cálculo de la distribución para cualquier rango de constantes de afinidad, en la práctica está limitada por un rango de constantes K determinado por el intervalo de concentración en el que se obtiene la isoterma. Típicamente estos límites están determinados por $K_{max}=I/F_{min}$ y $K_{min}=I/F_{max}$. Entre estos límites, la distribución es exacta. Extrapolaciones fuera de estos límites pueden conducir a errores importantes, especialmente si la isoterma cubre sólo la región de saturación o subsaturación.

Las figuras 6.11 y 6.12 (Tablas, T-8 y T-9) muestran las DA obtenidas con MIP y NIP para la ILF y la IF en formato logarítmico ($\log N$ vs. $\log K$) y semilogarítmico (N vs. $\log K$).

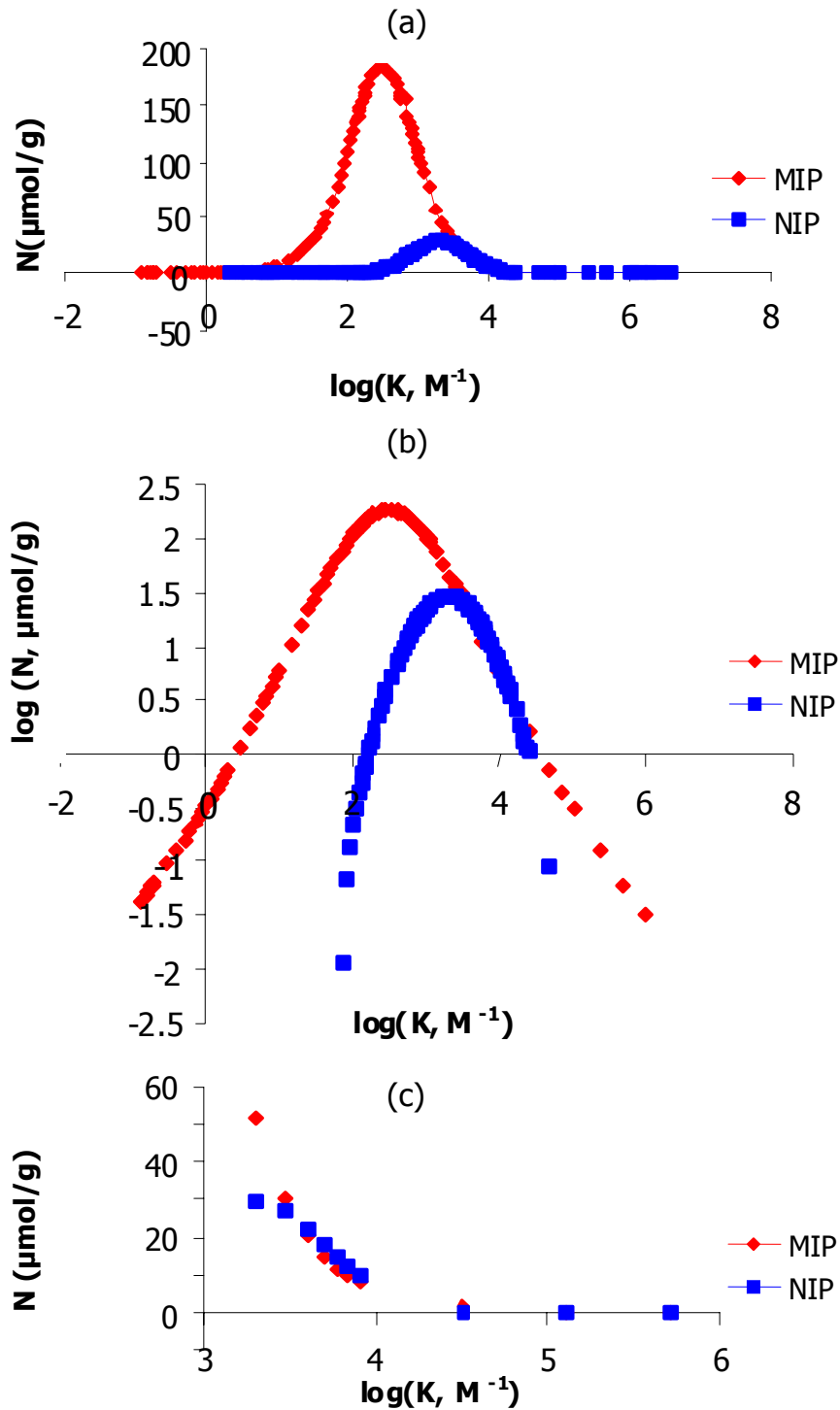


Figura 6.11. (Tablas, T-8).- (a) y (b) corresponden a las distribuciones de afinidad global para la ILF en formato semilogarítmico y logarítmico respectivamente en todo el rango de afinidades. (c) es la misma distribución limitada por K_{max} y K_{min} .

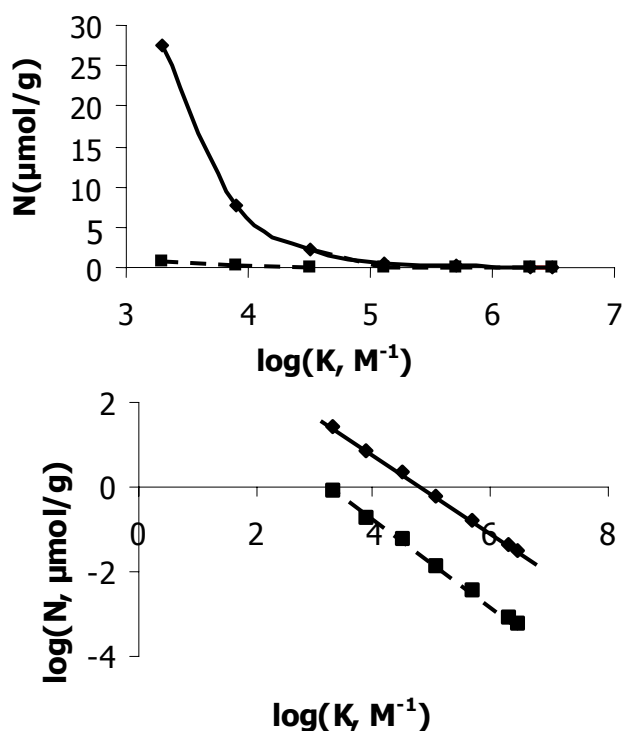


Figura 6.12. (Tablas, T-9).- (a) y (b) se corresponden con las distribuciones de afinidad para la IF en formato semilogarítmico y logarítmico, respectivamente en el rango de afinidades limitado por K_{max} y K_{min} . MIP (trazo continuo); NIP (trazo discontinuo).

La distribución de afinidad para la ILF corresponde a una distribución de energía unimodal con una forma cuasi-Gaussiana que decae exponencialmente. Esta forma es concordante con lo que sucede si se utiliza la IF a bajas concentraciones.

El pico de la distribución está centrado en $K_o = a^{1/m}$. El número total de sitios de unión N_t corresponde al área bajo la curva cuando se realiza un ajuste N vs. $\log F$. Cuando se comparan las distribuciones de afinidad de MIP y NIP se observa que poseen sitios de unión con afinidades similares a bajas concentraciones. Es decir, la región con los sitios de unión de mayor afinidad es común para ambos. Sin embargo, el MIP

posee un importante conjunto de sitios de unión con afinidad relativamente elevada que coincide con la constante de afinidad promedio, K_o .

Si se restringe este estudio al intervalo de concentraciones estudiadas (K_{min} - K_{max}) (figura 6.11c), puesto que estamos en el tramo más bajo de concentraciones no se aprecian demasiadas diferencias entre las DA para MIP y NIP, observando la curva exponencial decreciente típica de las regiones de concentración más baja, o dicho de otro modo, la región en la que se evalúan los sitios de unión de mayor afinidad resulta en el caso de MIP y NIP bastante similares.

Las distribuciones de afinidad de MIP y NIP para la IF se corresponden con una curva exponencial decreciente. La mayor diferencia extraída de las DA de MIP y NIP es la mayor capacidad de retención del MIP frente al NIP en la ventana de concentración medida, al poseer en todo el rango de concentraciones un mayor número de sitios de unión (N) para una misma afinidad (K). Esta visión cualitativa a partir de las curvas se confirma a través de sus capacidades respectivas (N_{k1-k2}) para un conjunto de sitios de unión similar ($K_1=2000 \text{ M}^{-1}$ y $K_2=3069000 \text{ M}^{-1}$). El MIP tiene un número de sitios de unión ($N_{k1-k2}=13.01 \text{ } \mu\text{mol/g}$) que es del orden de 16 veces mayor que el NIP ($N_{k1-k2}=0.84 \text{ } \mu\text{mol/g}$). En cuanto a las constantes de afinidad promedio también existe una diferencia significativa entre MIP ($K_{k1-k2}=20389.03 \text{ M}^{-1}$) y NIP ($K_{k1-k2}=15091.40 \text{ M}^{-1}$).

6.4.7.- Estudio de selectividad

La selectividad en el enlace de los MIPs puede relacionarse con la orientación espacial de los monómeros funcionales alrededor de la molécula molde durante el proceso de polimerización. De este modo, el número y tipo de grupos funcionales en una molécula molde permiten formar interacciones no covalentes con los monómeros funcionales

condicionando no sólo la fortaleza de la interacción monómero-molécula molde sino la posibilidad de enlazar de forma eficaz otras moléculas relacionadas estructuralmente con la molde.

Se podrían considerar dos tipos de factores que son determinantes en la selectividad del MIP: la contribución estérica debido a la forma de la molécula molde y la contribución de enlace, debido a la interacción no covalente entre el monómero funcional y la molécula molde. Ambos factores son importantes y contribuyen a la especificidad del MIP; la contribución estérica determina la forma del sitio de unión, así que, por ejemplo, un analito más voluminoso que la molécula molde no se retendría con facilidad en el MIP. La contribución de enlace debido a la interacción no covalente es igualmente importante porque de la fortaleza de la interacción molde-monómero depende la eficacia del proceso de reconocimiento molecular.

Puesto que la selectividad del MIP depende en gran medida de los componentes seleccionados en la mezcla de prepolimerización, una vez determinados los óptimos mediante cálculos DFT se pretende comprobar la selectividad del MIP midiendo la concentración de distintos análogos estructurales enlazados por el polímero sintetizado en condiciones idénticas a las utilizadas para el enlace de la molécula molde.

La selección de moléculas de prueba para el estudio de la selectividad se realizó en base a la presencia de grupos funcionales similares a los de la molécula molde con el fin de obtener información de la naturaleza de los sitios de unión en el polímero. Así, se realizó un estudio comparativo con ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico o ácido vanillilmandélico, (VMA), ácido 3-hidroxi-4-metoximandélico o ácido isovanillilmandélico, (IVMA), y 4-hidroxi-3-metoxifeniletanol o alcohol homovanílico (MHPE), cuyas estructuras se presentan en la figura 6.13.

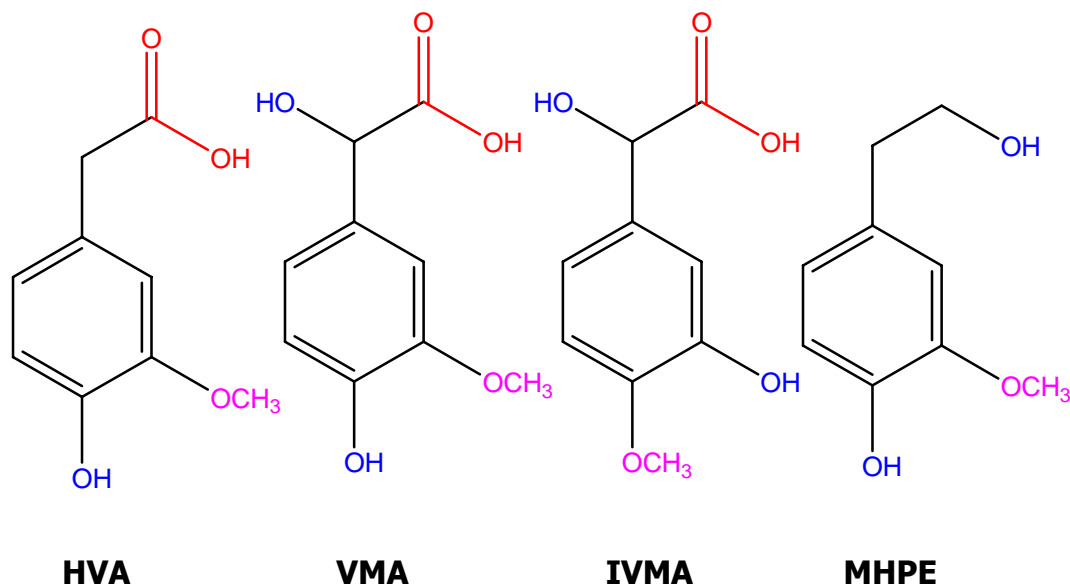


Figura 6.13.- Estructuras de las moléculas de prueba para la evaluación de la selectividad.

A partir del cálculo DFT se podría predecir la contribución de enlace, es decir, la contribución debido a la interacción no covalente entre el monómero funcional y la molécula molde. Experimentalmente se podrían evaluar las dos contribuciones de forma conjunta mediante ensayos de unión con el MIP y el NIP. Si la retención es idéntica para ambos, se podría decir que no se ha inducido huella molecular o no existe retención específica. Si por el contrario, se produce una mayor retención para el MIP que para el NIP, significa que debido a la contribución estérica (inducción de la forma de la molécula en el polímero) y también a la contribución de enlace no covalente, se ha inducido una huella molecular, responsable de la especificidad de la señal.

Para comprobar experimentalmente las predicciones teóricas, se realizó un ensayo de unión con una concentración fija de MIP y NIP de 10 mg/mL incubando en una concentración de 1×10^{-4} M de las moléculas de prueba anteriores para investigar la selectividad del polímero.

La especificidad de la señal se evaluó como el cociente de los porcentajes enlazados para el MIP y el NIP. Los resultados obtenidos se representan en el diagrama de barras de la figura 6.14.

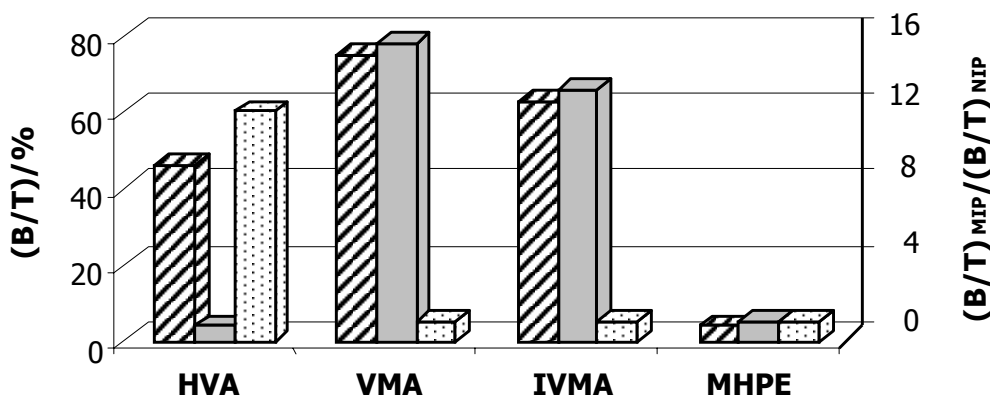


Figura 6.14. (Tablas, T-10).- Representación del porcentaje de enlace (B/T) de las distintas moléculas ensayadas para una concentración de molécula de prueba de 1×10^{-4} M y una concentración de MIP (▨) y NIP (■) de 10 mg/mL. La especificidad de la señal se evaluó como el cociente de porcentajes de enlace para MIP y NIP (▤) (escala de la derecha).

La molécula de VMA, que posee un grupo carboxilo terminal y los grupos metóxido e hidroxilo en las mismas posiciones que el HVA, interfiere fuertemente dando lugar a porcentajes de enlace superiores a los obtenidos con la molécula molde, hecho que concuerda con los resultados del cálculo de las energías de estabilización de los aductos de prepolimerización correspondientes.

La molécula de IVMA se diferencia de la de VMA en que las posiciones de los grupos metóxido e hidroxilo se encuentran intercambiados, en posición 4 y 3 respectivamente. Con esta molécula se observa una interferencia menor que en el caso anterior, por lo que todo parece indicar que la interacción a través de los grupos funcionales mencionados afecta en menor medida a la capacidad de reconocimiento de los sitios de unión que la interacción a través de los grupos ácidos.

Este hecho confirma los resultados teóricos, en el sentido de que los complejos formados a través de puentes de hidrógeno con los grupos funcionales metóxido e hidróxido son más desfavorables que aquellos que forman el doble puente de hidrógeno a través del grupo carboxilo.

Las moléculas de VMA e IVMA se retienen en la misma medida tanto en el MIP como en el NIP por lo que la señal obtenida puede considerarse íntegramente inespecífica. A este hecho podría contribuir la presencia de un grupo hidroxilo adicional en la cadena lateral de los dos compuestos anteriores que impediría ocupar los huecos generados por el HVA, bien sea debido a impedimentos estéricos o bien a repulsiones electrostáticas.

La molécula de MHPE se diferencia de las demás moléculas ensayadas en que posee un grupo hidroxilo terminal en lugar del grupo ácido del HVA, manteniendo las posiciones del grupo metóxido e hidroxilo en posición 3 y 4 respectivamente, como en la molécula molde. Como se demuestra en la figura 6.15, la señal de la fracción no enlazada para el MIP es prácticamente igual a la del blanco (disolución sin polímero). Esto indica que la molécula de MHPE prácticamente no se retiene en el polímero, a pesar de la posibilidad de formar un puente de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y metóxido y el ácido carboxílico del sitio de unión.

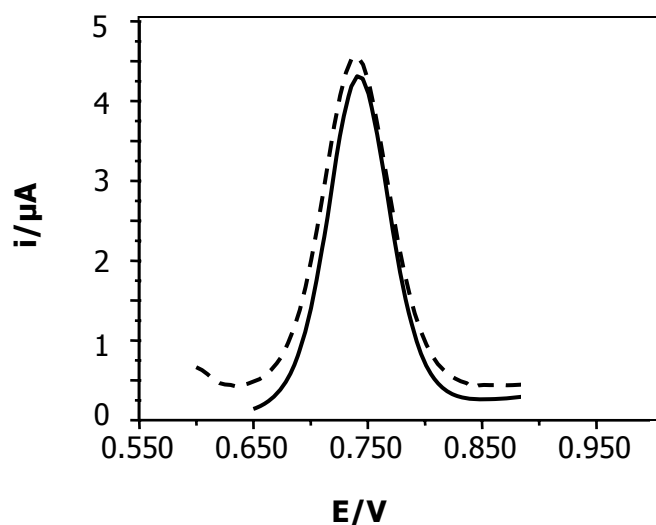


Figura 6.15.- Voltamperograma diferencial de pulso obtenido a partir de una disolución patrón de MHPE de concentración 1×10^{-4} M (línea discontinua) y a partir del sobrenadante de una incubación del MIP realizada con 1×10^{-4} M de MHPE en tolueno (línea continua).

Al igual que ocurría para las moléculas de VMA e IVMA, MHPE presenta idénticos porcentajes de retención para el MIP y el NIP, por lo que la señal obtenida (mínima en este caso) es íntegramente inespecífica.

Además, se puede observar un comportamiento diferenciado del MHPE respecto de las moléculas anteriores, ya que es la que presenta menor porcentaje de enlace (4%) frente a un 46% de retención del HVA. Parece ser, que la sustitución del grupo ácido del HVA por un grupo hidroxilo modifica drásticamente la afinidad por el sitio de reconocimiento. Dicho de otro modo, la formación del doble puente de hidrógeno en los sitios de unión sería la interacción que define el enlace (en mayor medida que la interacción a través de los grupos metóxido e hidroxilo en posiciones 3 y 4 respectivamente), confirmándose así los resultados obtenidos mediante cálculos DFT (sección 4.3).

Por último, para la molécula de HVA, la relación entre los porcentajes de retención MIP/NIP es 12 a 1, conduciendo a una retención fundamentalmente específica de la molécula molde. A su vez, todo apunta a que el MIP y el NIP presentan un comportamiento diferenciado que sólo puede deberse a la presencia del HVA en la mezcla de polimerización del MIP. Es decir, se ha inducido una huella molecular en el MIP capaz de reconocer específicamente a la molécula molde.

A modo de conclusión, se podría decir que el MIP sintetizado a partir del disolvente y monómero funcional óptimo predicho por el método computacional desarrollado en este trabajo constituye un eficaz elemento de reconocimiento para la molécula molde.

Capítulo 7

Construcción de un sensor voltamétrico para ácido homovanílico

7.1.- Antecedentes

7.1.1.- Sensores electroquímicos basados en el reconocimiento molecular por polímeros impresos

Como se comentó anteriormente, las principales aplicaciones analíticas de los MIPs han sido en el campo de las separaciones. Así, se han desarrollado sistemas de extracción en fase sólida con el fin de preconcentrar el analito y separar interferentes²¹³⁻²¹⁶ y fases estacionarias para métodos basados en cromatografía de afinidad o electroforesis capilar^{15, 217-221}, permitiendo en ocasiones la resolución de mezclas racémicas.

En otros casos, se utilizaron los MIPs en ensayos de unión con diversos analitos, y la afinidad, límites de detección y selectividad encontrados fueron similares a los obtenidos con receptores biológicos²²²⁻²²⁷.

Precisamente la elevada selectividad y afinidad de los MIPs por la molécula molde, junto con sus buenas propiedades físicas y químicas, hace que estos materiales artificiales sean elementos ideales de reconocimiento molecular en el diseño de sensores²²⁸⁻²³⁰.

Un amplio número de sensores basados en MIPs utilizan la acumulación de masa en la capa de polímero como sucede en el caso de transductores piezoeléctricos²³¹⁻²⁴³. También se han desarrollado sensores con polímeros molecularmente impresos que utilizan propiedades ópticas del analito para su detección²⁴⁴⁻²⁴⁹.

Sin embargo, en contraste con el gran aumento del número de publicaciones que utilizan MIPs en separaciones analíticas, el desarrollo de sensores haciendo uso de MIPs es significativamente más lento y el número de publicaciones es inferior.

Como se ha mencionado en la introducción de esta Tesis, los sensores electroquímicos en particular²⁵⁰⁻²⁵³, tienen gran interés porque podrían ofrecer buenos límites de detección, a bajo coste, con posibilidad de fácil miniaturización y automatización.

7.1.2.- Elementos de reconocimiento y tipos de transducción

Puesto que la mayoría de los trabajos en reconocimiento molecular por efectos de impresión se llevaron a cabo usando polimerización radicalaria de distintos tipos de polímeros acrílicos o vinílicos, estos sistemas fueron los primeros en ser ensayados para sensores. Aunque actualmente se está desarrollando investigación sobre sensores electroquímicos con otros sistemas como polímeros electrogenerados²⁵⁴⁻²⁶⁷ polímeros inorgánicos²⁶⁸⁻²⁷¹, y monocapas autoensambladas²⁷²⁻²⁷⁵, los polímeros acrílicos siguen siendo los de uso más frecuente, y en consecuencia, la revisión bibliográfica se centrará en estos últimos.

Los estudios correspondientes al desarrollo de sensores de MIPs basados en polimerización radicalaria con diferentes tipos de monómeros acrílicos o vinílicos han sido clasificados en dos tipos: aquellos que usan los MIPs como partículas generadas después de la molienda del monolito polimérico (tabla 7.1 y continuación), y aquellos que preparan los MIPs como un película en la superficie del transductor (tabla 7.2 y continuación).

Tabla 7.1.- Sensores electroquímicos basados en MIPs de forma particulada de base acrílica o vinílica.

Monómeros	Transducción/ sustrato	Iniciador	Molécula molde	Observaciones	Medio de enlace	Medio de medida	Calibración	Ref.
MAA/EGDMA (1:5)	Amperometría/Pt	Térmico AIBN	Morfina	MIP particulado (1-25 μ m) inmovilizado con gel de agarosa. Ensayo competitivo Alta selectividad. Largo tiempo de respuesta (~24 h)	Citrato 20 mM pH6+10% EtOH	Citrato 20 mM pH 6+10% EtOH.	0.1-10 μ g/ml LOD: 0.05 μ g/ml	276
4-vinilpiridina/ EGDMA (1:5)	DPV/Electrodos serigrafiados	Térmico ADV N	Ácido 2,4- Diclorofenoxi- acético (herbicida)	MIP particulado (1-25 μ m) Inmovilizado con gel de agarosa Ensayo competitivo Un solo uso	Fosfato 20 mM pH7 + 10% MeOH	0.1 KCl en Fosfato 20 mM + 10% MeOH	1-1000 μ M	277
Estireno/DVB (19:1)	CV, DPV/ Electrodos serigrafiados	Térmico AIBN	1- hidroxipireno (metabolito de PAH)	Partículas grosor <53 μ m incorporadas en tinta Ensayo no competitivo Un solo uso	MeOH al 35% en agua	50% MeOH, en fosfato 0.025 M pH 12	0.1-1 mM	278
MAA/EGDMA (1:5) acetonitrilo	DPV/Grafito en material compuesto	Térmico AIBN	Clenbuterol	Ensayo competitivo Tiempo de respuesta~ 45 min Renovación de la superficie electródica por pulido mecánico Reproducible (RSD 3.81 %)	Disoluciones acuosas	HClO ₄ 50 mM +10% EtOH	0.004-25 mM	279
Vinilimidazol/DVB (1:9) acetonitrilo	Amperometría/ Electrodo de pasta de carbono	Térmico AIBN	Paraoxon (Insecticida)	Partículas 10-25 μ m Medidas a 40 °C	Tris HCl 1 M pH 9	1 M Tris HCl pH 9	LOD:100 μ M	280

Tabla 7.1.- Continuación.

Monómeros	Transducción/ sustrato	Iniciador	Molécula molde	Observaciones	Medio de enlace	Medio de medida	Calibración	Ref.
MAA/EGDMA (1:2) Cloroformo	Espectroscopía de impedancias/Pt	Térmico AIBN	L-nicotina	MIP particulado <25 µm incorporado a una superficie de Pt recubierta por rotación con un polímero conjugado: poli(2- metoxi-5-(3',7'-dimetiloxi))- 1,4-fenilvinileno (OC1C10-PPV)	Fosfato salino	Fosfato salino	2-5 nM	281
MAA/TRIM (1:1.25) Acetonitrilo/ tolueno (11:1)	Amperometría/ Electrodo de carbono vitrificado	Térmico AIBN	Hidroquinona	Polimerización por precipitación Las partículas se sujetan al electrodo con una capa de gel de agarosa Partículas 700 nm diámetro	Fosfato salino	Fosfato salino	2-100 µM	282
MAA/TRIM (1:2) y (1:4) Acetonitrilo	CV, Amperometría/ Electrodo de carbono vitrificado	Térmico AIBN	Dopamina	Inmovilización de partículas de un composite de nanotubos multicapas (funcionalizado con grupos vinilo) y MIP con una capa de gel de agarosa Capas de polímero de grosor 15- 20 nm Selectividad para epinefrina y ácido ascórbico Tiempo de respuesta: 20 min	Fosfato salino	Fosfato salino	5.0×10^{-7} - 2.0×10^{-4}	283

MAA: ácido metacrílico

AIBN: 2,2'-azobis-2-isobutironitrilo

DVB: Divinilbenceno

LOD: límite de detección

n.d: no disponible

EGDMA: ácido etilenglicoldimetacrilato

ADVN: 2,2'-azobis-2,4-dimetil-valeronitrilo.

TRIM: trimetilolpropano trimetacrilato

PAH: Hidrocarburo aromático policíclico

Tabla 7.2.- Sensores electroquímicos basados en MIPs de base acrílica o vinílica preparados como películas.

Monómeros	Transducción/ substrato	Iniciador	Molécula molde	Observaciones	Medio de enlace	Medio de medida	Calibración	Ref
MAA/EGDMA (1:5) cloroformo	ISFET/Silicon wafer	Térmico AIBN	L-fenilalanina anilida	Grosor de medidas Medidas en flujo. Silanización Mezcla de polimerización prensada con un vidrio Mala reproducibilidad entre sensores	EtOH (95%)	EtOH (95%)	n.d.	284
DEAEM/ EGDMA (1:5) DMF	Conductométrico/ Filtro de vidrio	Térmico AIBN	Atrazina	Mala reproducibilidad Se necesitan 12 horas para recuperación de la señal Tiempo de respuesta: 30 minutos	50 mM Tris pH 8	50 mM Tris pH 8	0.01-0.50 mg L ⁻¹	285
MAA o DEAEM + EGDMA DMF	Conductométrico/ Filtro de vidrio	Térmico AIBN	L-Fenilalanina, 6-amino-1- propiluracilo, atrazina, Acido salicílico	Impresión covalente y no covalente Tiempo de respuesta: 30 min	50 mM Tris pH 8	50 mM Tris pH 8	1-50 µM	286
MAA+TEDMA +OUA (DMF, cloroformo)	Conductométrico	Fotoquímico AIBN	Atrazina	Mezcla de monómeros entre dos placas de cuarzo Película fina, flexible y estable RSD<5% Membrana de 60-120µm Tiempo de respuesta: 6-10 min	Fosfato 25 mM pH 7.5+35 mM NaCl	Fosfato 25 mM pH 7.5+35 mM NaCl	5-100 nM	287 288
MAA/EGDMA (1:4.5) DMF	CV/ITO	Fotoquímico AIBN	Teofilina	Silanización sobre ITO y unión covalente de la película polimérica Sólo se realizan estudios de selectividad	0.1 M KNO ₃ 5 mM+ Fe(CN) ₆ ⁻²	0.1 M KNO ₃ 5 mM + Fe(CN) ₆ ⁻²	n.d.	289
AMPS/MBA (1:2) H ₂ O	Capacitivo/Au con SAM de hexadecanotiol	Fotoquímico benzofenona	Desmetrín	Capa de 10 nm Tiempo de respuesta: 5 min	100 mM KCl + 5 mM fosfato pH 7.2	100 mM KCl + 5 mM fosfato pH 7.2	1-7 mM	290

Tabla 7.2.- Continuación.

Monómeros	Transducción/ substrato	Iniciador	Molécula molde	Observaciones	Medio de enlace	Medio de medida	Calibración	Ref.
AMPS/MBA (1:2) H ₂ O	Capacitivo/Au con SAM de hexadecanotiol	Fotoquímico benzofenona	Creatinina (metabolito)	MIP formado con inmovilización inicial de fotoiniciador RSD 10%, Reproducible 6 meses Tiempo de respuesta: 2 min	100 mM KCl + 5 mM fosfato pH 7.2	100 mM KCl + 5 mM fosfato pH 7.2.	10 µM-600 µM	291
MAA/EGDMA (1:5) acetónitrilo	DPV/Electrodo de carbono vitrificado	Fotoquímico acetofenona	Ácido vanillil- mandélico	Recubrimiento bajo rotación Tiempo de respuesta: 25 min	Acetonitrilo	25 mM citrato+ 10% acetónitrilo	0.1-1.5 mM	292
MAA/EGDMA (1:4) Tolueno y DMSO VPY/EGDMA (1:4) DMSO	DPV/Electrodo de carbono vitrificado	Fotoquímico acetofenona	Ácido homovanílico	Recubrimiento bajo rotación Tiempo de respuesta: 15 min	Tolueno o DMSO	Citrato/HCl 0.1 M + 40 % acetónitrilo	7×10^{-9} - 1×10^{-5}	117
MAA/EGDMA (1:7) DMF	CV/Oro depositado sobre cristal de microbalanza	Fotoquímico AIBN	Atrazina	Recubrimiento del oro con alilmercaptanos y unión covalente de la capa polimérica Capas de grosor no controlado entre 50 y 80 µm Tiempo de respuesta: 10 min Selectividad para otros herbicidas	KCl 0.1 M	KCl 0.1 M	1-10 µM	293
MAA/EGDMA(1:5) DMF	CV/ITO-silicona	Térmico AIBN	Teofilina	Silanización sobre ITO y unión covalente de la capa polimérica	0.1 M KNO ₃ 5 mM + Fe(CN) ₆ ⁻²	0.1 M KNO ₃ 5 mM + Fe(CN) ₆ ⁻²	n.d	294
MAA/EGDMA	CV/Pt	Fotoquímico benzofenona	Bilirrubina	Inmovilización inicial sobre el Pt de disolución de alilmercaptano y unión covalente del MIP Recubrimiento bajo rotación	n.d	n.d	2.30×10^{-5} - 1.19×10^{-4}	295

ISFET: Transistor de efecto campo sensible a iones **ITO:** óxido de indio-estaño **DMF:** N, N'-dimetilformamida **AMPS:** ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico **MBA:** N,N'-metilenediacrilamida **DEAEM:** dietiloaminoetil metacrilato **TEDMA:** trietilenglicoldimetacrilato **OUA:** oligouretano acrilato
SAM: monocapa autoensamblada **n.d:** no disponible

En todos los casos los monómeros funcionales utilizados fueron ácido metacrílico (MAA), 4-vinilpiridina (VPY) y derivados de acrilamida. La polimerización térmica se inicia normalmente con 2,2'-azo-2-isobutironitrilo (AIBN), mientras que la polimerización fotoquímica se lleva a cabo con AIBN, benzofenonas o derivados de la acetofenona. Entre los disolventes porogénicos, se emplea frecuentemente un disolvente polar como la dimetilformamida (DMF) cuando el objetivo es desarrollar un sensor para aplicaciones acuosas para minimizar efectos de hinchamiento^{284, 286, 287}. Se han utilizado también disoluciones acuosas de monómeros para obtener capas muy finas en la superficie del electrodo^{290, 291}.

En las tablas anteriores se observa también que las técnicas de transducción que han sido empleadas para la preparación de sensores electroquímicos basados en MIPs pueden ser: conductométricas, capacitivas, amperométricas, voltamétricas, de efecto de campo y espectroscopía de impedancias. De ellas, la voltametría puede llegar a ser la técnica de transducción más selectiva, puesto que el potencial de oxidación o reducción es una propiedad intrínseca del analito.

Se han usado varios tipos de voltametría: la de barrido lineal (LSV) y voltametría cíclica (CV), donde el potencial aplicado cambia linealmente con el tiempo, y la voltametría diferencial de pulso (DPV), donde el barrido de potencial aplicado no es una función lineal, sino que se forma por incrementos constantes en una rampa lineal. Esta última técnica ofrece mejor sensibilidad, porque consigue mejorar la relación señal-ruido.

Con la mayoría de los tipos de transducción electroquímica y los dispositivos piezoeléctricos la unión de la molécula molde al MIP es suficiente para generar una señal analítica. Por el contrario, en aquellos sensores de MIPs basados en diseños amperométricos y voltamétricos es necesaria una etapa de transferencia electrónica.

Esta etapa puede dar lugar a productos que causen pasivado de la superficie electródica. Además, la señal no se recupera mientras la superficie del transductor no esté libre de productos adsorbidos, independientemente de la reversibilidad de la unión al elemento de reconocimiento.

Este problema se ha tenido en cuenta en las aplicaciones publicadas, y en algunos casos, la fácil preparación y bajo coste de los materiales permiten el empleo de electrodos de un solo uso^{277, 278}. Otra estrategia analítica consiste en preparar una barra de material compuesto que contenga partículas de MIP en una matriz sólida, donde la superficie puede ser regenerada por simple pulido²⁷⁹. Otra forma de regenerar la superficie es mediante lavado si se encuentra un buen disolvente para los productos de la reacción electródica²⁹², aunque la recuperación total del electrodo es difícil debido al acceso restrictivo a través de los poros del polímero. Por tanto el tamaño y volumen de poros de la fase sensora será un aspecto crítico del diseño del sensor, y la propia tecnología de impresión molecular permite su manipulación a conveniencia. Se conoce, por ejemplo, que ciertos disolventes como el acetonitrilo generan mesoporos mientras que el cloroformo produce microporos³⁶.

En general, para todas estas técnicas el medio en el que se efectúan las medidas electroquímicas es una disolución de electrolito inerte (tablas 7.1 y 7.2). Se observa una tendencia a trabajar con bajos valores de fuerza iónica (<50 mM), probablemente para facilitar las interacciones iónicas entre molécula impresora y polímero. Cuando se usan polímeros acrílicos o vinílicos las medidas se llevan a cabo frecuentemente en un medio mixto con disolventes orgánicos como etanol o acetonitrilo para mejorar el mojado de la capa polimérica. En ocasiones también se incluyen en el medio de medida sales como cloruro o perclorato de litio y

perclorato de tetraetil amonio para mejorar la conductividad de la membrana polimérica²⁹³.

En la detección voltamétrica de analitos electroactivos, se requiere además que el medio de medida favorezca la liberación del analito de los sitios de unión y éste difunda hacia la superficie electródica.

7.1.3.- Estrategias de integración transductor electroquímico-MIP

El lento desarrollo de sensores basados en MIPs parece indicar que la adaptación de la síntesis de estos materiales a la tecnología de sensores no es un asunto sencillo, y se necesitan desarrollar estrategias de integración específicas para este nuevo tipo de elemento de reconocimiento.

Se pueden distinguir sin embargo dos tendencias: inmovilización del polímero acrílico molido y tamizado, y la preparación directa del material como película delgada sobre la superficie del transductor.

A. Integración con material particulado

Puesto que la mayoría de las aplicaciones de los MIPs requieren la preparación de un monolito que tenga que ser molido y tamizado, gran parte de los estudios de sensores basados en MIP concentran sus esfuerzos en la inmovilización de partículas poliméricas lo más próximas posibles a la superficie del transductor. Así, el gel de agar se ha utilizado en este sentido para inmovilizar partículas de MIP en electrodos de platino para la detección amperométrica de morfina²⁷⁶, en superficies de electrodos de carbono vitrificado para la detección amperométrica de hidroquinona²⁸², en la superficie de electrodos serigrafiados (*screen-printed*) para la determinación voltamétrica de herbicidas²⁷⁷, o formando un composite gel de agar-nanotubos de carbono-MIP para la

determinación de dopamina²⁸³. También existen estrategias de incorporación de las partículas del MIP en un polímero conjugado: poli (2-metoxi-5-(3',7'-dimetiloctiloxi))-1,4-fenilenvinileno (OC1C10-PPV)²⁸¹.

Por otra parte, una membrana de plástico con cloruro de polivinilo (PVC) podría usarse para inmovilizar partículas de MIP. Esta estrategia se ha seguido en varias aplicaciones descritas en sensores piezoeléctricos²⁹⁶. Sin embargo, algunos autores que utilizaron transducción voltamétrica observaron adsorciones inespecíficas con este tipo de membranas²⁹⁷.

En relación con las estrategias más frecuentes de integración de MIPs para el desarrollo de biosensores, la modificación de pastas de carbono incorporando enzimas u otros agentes ha sido ampliamente utilizada en combinación con transducción amperométrica.

Estos tipos de electrodos incorporando partículas de MIP podrían simplificar mucho el desarrollo de sensores amperométricos y voltamétricos. Además, la pasta de carbono es una opción fácil para el diseño de sensores voltamétricos de un solo uso eliminando los problemas relacionados con la renovación de la superficie. Sin embargo, la necesidad de utilizar disolventes orgánicos restringe el uso de este tipo de electrodos, a menos que se haya comprobado que el MIP es efectivo en medio acuoso mediante ensayos de unión u otro tipo de medida. Con este tipo de estrategia sólo hemos podido confirmar la publicación de una aplicación en disolución acuosa²⁸⁰.

Otras formas de inmovilización exploradas consisten en preparar una tinta compuesta incorporando las partículas de MIP para producir electrodos serigrafiados²⁷⁸, o formar un electrodo compuesto con el polímero particulado, grafito y una matriz sólida de unión tal como n-eicosano²⁷⁹.

B. Integración a través de películas poliméricas

La estrategia de integración más utilizada hasta la fecha consiste en la preparación del elemento de reconocimiento como una película en la superficie del transductor. Se requiere en este caso un buen control del espesor de la capa del polímero para adaptar el tiempo de respuesta del sensor y ajustar su sensibilidad.

Las estrategias que han sido empleadas para preparar y fijar a la superficie del electrodo una fina capa de polímero obtenido por técnicas de polimerización radicalaria son:

- Recubrimiento bajo rotación (*spin-coating*)^{117, 292, 298-301}: una alícuota de la mezcla de polimerización se deposita sobre la superficie del electrodo y se somete a rotación a una velocidad controlada. El exceso de mezcla precursora se elimina y sólo queda una capa fina en la que se produce el proceso de polimerización.
- Silanización: el sustrato metálico se empapa en una disolución de 3-metacrilopropiltrimetoxisilano. Luego, se sumerge en la mezcla de monómeros acrílicos. Después de la polimerización, el copolímero débilmente adsorbido se elimina por lavado en agua, y sólo el polímero unido covalentemente permanece en la superficie electródica^{154, 284, 289, 294}.
- Técnica *sandwich*: una gota de mezcla de polimerización se deposita sobre el transductor y se cubre con un disco de cuarzo, o se deposita entre dos discos de cuarzo. Esta técnica se ha aplicado a la preparación de sensores piezoeléctricos y membranas para conductometría^{285-288, 302-304}.

- "*Grafting*": inmovilización del iniciador radicalario sobre la superficie del transductor. Posteriormente se deposita la mezcla de polimerización, y después de eliminar el exceso, sólo una fina película permanece sobre la superficie del sensor^{290, 291}.
- Empleo de alilmercaptanos: se sumerge el electrodo en una disolución de alilmercaptano (2-propeno-1-tiol) para introducir grupos vinilo a la superficie de oro o platino. Posteriormente se adiciona la mezcla de polimerización y el MIP se une covalentemente a la superficie^{293, 295}.

Quizá la información más relevante que puede extraerse de los datos de la bibliografía en relación a la preparación de películas poliméricas molecularmente impresas para sensores es que su flexibilidad (controlada por la relación de monómero funcional a entrecruzador, o por adición de monómeros de la familia de los oligoureanos) es un parámetro relevante directamente relacionado con las prestaciones analíticas del sensor. Las fórmulas más tradicionales incluyen altas relaciones de entrecruzador (5 a 1 de monómero funcional) para favorecer la creación de sitios de impresión y obtener la fortaleza mecánica requerida para fases estacionarias cromatográficas.

Una observación importante de algunos autores es que con menos de un 20% de entrecruzador todavía es posible observar efectos de memoria mediante ensayos de unión¹⁷⁶.

Finalmente, se ha observado en algunos casos que cuando se usan películas delgadas para sensores, algún grado de flexibilidad del polímero favorece la unión de la molécula impresora y mejora la adherencia a la superficie electródica. Esta tendencia fue seguida con diseños ópticos^{305, 306} y piezoeléctricos^{176, 302-304, 307} y sólo con algunos tipos de sensores

electroquímicos^{287, 288, 290, 291}. En consecuencia, siempre es necesario un compromiso entre la proporción mínima de entrecruzador necesaria para observar memoria para el analito y la suficiente flexibilidad polimérica para tener adherencia.

7.1.4.- Características analíticas

Se resumen a continuación las características analíticas encontradas en los trabajos sobre sensores electroquímicos basados en tecnología de impresión molecular.

A. Límites de detección

Frecuentemente se ha publicado que uno de los principales problemas del desarrollo de aplicaciones analíticas con MIPs acrílicos es la dificultad de obtener bajos límites de detección³⁰². Por tanto, en el diseño de sensores electroquímicos es aconsejable el empleo de tipos de transducción más sensibles, como por ejemplo, amperometría o DPV, aunque el límite de detección seguirá dependiendo de una combinación del tipo de transducción y de las características relacionadas con la fase de reconocimiento.

B. Selectividad

Una de las dificultades de los protocolos de medida que suelen hacer necesaria una etapa de extracción en el elemento de reconocimiento (MIP) es el fuerte efecto de la adsorción inespecífica en la superficie electródica, particularmente cuando se utilizan electrodos de carbono²⁷⁷. En algunos casos, se ha examinado la selectividad del elemento de reconocimiento mediante una serie de ensayos de unión, pero no con el sensor, ignorando de esta forma importantes interferencias²⁷⁸.

En este sentido, la voltametría como técnica de transducción tiene la ventaja adicional de permitir optimizar el medio de unión y el medio de medida separadamente para mejorar la selectividad. (Los restantes tipos de transducción electroquímica usan el mismo medio de medida para la unión y la detección). Además, interferentes estructuralmente próximos pueden ser identificados por sus diferentes potenciales electroquímicos²⁹².

C. Reproducibilidad

Idealmente, estos sistemas de reconocimiento deberían ser completamente reversibles mediante ciclos alternativos de lavado y unión para recuperar las propiedades de reconocimiento. A veces, la recuperación completa requiere largos tiempos de lavado de hasta 12 horas²⁸⁶. Sin embargo, la recuperación parcial de un elemento de reconocimiento no es un problema porque los sensores electroquímicos basados en MIPs pueden extenderse a dispositivos desechables de bajo coste. Igualmente, se han publicado aplicaciones con electrodos serigrafiados^{277, 278}.

D. Aplicación a muestras reales

Los sensores publicados hasta la fecha han sido ensayados sólo con disoluciones patrón, encontrándose en la bibliografía una única publicación para muestras enriquecidas (clenbuterol en extractos de hígado²⁷⁹). Por lo tanto, todavía no hay datos sobre la influencia de los efectos de matriz en la respuesta de sensores con diferentes tipos de elementos de reconocimiento y transducción. Sin duda un reto importante para el futuro desarrollo de este tipo de sensores.

E. Tiempo de respuesta. Estabilidad del sensor a largo plazo

En general, se han obtenido mayores tiempos de respuesta con sensores que usan partículas de MIP que con películas poliméricas, debido a la dificultad de difusión. Con los primeros, el tiempo de respuesta del sensor está relacionado íntimamente con el tamaño de partícula. La mayoría de autores que trabajan con partículas de MIP utilizan fracciones de partículas superiores a $25\ \mu\text{m}^{279}$ o incluso $50\ \mu\text{m}^{278}$. Los sensores así contruidos conducen a procesos de difusión intrapartícula con cinéticas muy lentas y, consecuentemente, largos tiempos de respuesta, aunque recientemente se han publicado estudios con tamaños de partícula menores²⁸⁰⁻²⁸³.

Los tiempos de respuesta más cortos se alcanzaron cuando el polímero se sintetiza en forma de capa delgada sobre el transductor^{290, 291}.

Los sensores que usan MIPs acrílicos o vinílicos tienen buena estabilidad durante almacenamiento prolongado (más de 6 meses en algunos casos), como cabría esperar para un polímero altamente entrecruzado.

En base a lo expuesto en esta sección, se ha seleccionado como sistema de prueba para la comprobación de las predicciones teóricas, la preparación de un MIP como película delgada sobre la superficie de un electrodo de carbono vitrificado mediante la técnica de recubrimiento bajo rotación y polimerización fotoquímica. La técnica de medida empleada fue voltametría diferencial de pulso (uno de los tipos de transducción más selectivos y sensibles). Con los escasos antecedentes bibliográficos para este tipo de transducción, se puede decir que esta segunda parte del trabajo constituye por sí sola un gran reto.

7.2.- Oxidación electroquímica del ácido homovanílico sobre electrodos de carbono vitrificado

La caracterización del comportamiento electroquímico del HVA sobre electrodos de carbono vitrificado se realizó utilizando como técnica de trabajo la voltamperometría cíclica. En la figura 7.1 se muestra el voltamperograma cíclico obtenido a una concentración de HVA de 2×10^{-4} M en una disolución de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10. El barrido lineal de potencial se llevó a cabo entre -0.250 y 1.200 V con vuelta al potencial inicial a una velocidad de barrido de potenciales de 50 mV/s.

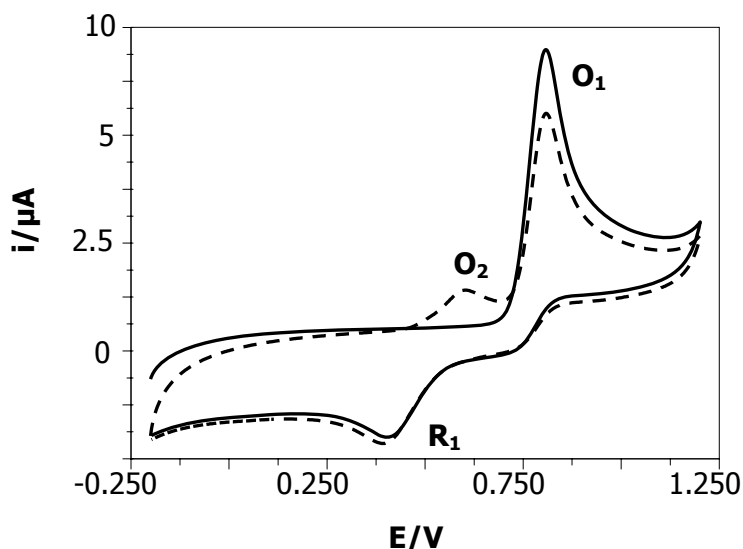


Figura 7.1.- Voltamperograma cíclico obtenido a una concentración de HVA de 2×10^{-4} M en citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10 para un electrodo de carbono vitrificado. Primer barrido de potencial (trazo continuo) y segundo barrido sucesivo (trazo discontinuo).

Se observó un proceso redox irreversible en el primer barrido, presentando un pico de oxidación O_1 a un potencial de 0.806 V, y un pico de reducción R_1 a un potencial de 0.410 V. En el segundo barrido de potencial aparece un segundo pico de oxidación O_2 a un potencial de 0.596 V, fruto de la oxidación del HVA.

Como se ha descrito para electrodos de pasta de carbono (apartado 6.2), este voltamperograma cíclico se corresponde con una oxidación seguida de reacción química rápida acoplada^{203, 204}. Parece ser que el mecanismo de la oxidación en disolución ácida involucra dos electrones a través de una reacción química rápida con agua para eliminar un mol de metanol y la quinona correspondiente.

Al igual que en el capítulo anterior, se escogió como señal analítica para la determinación de HVA el pico de oxidación O_1 a $\text{pH}=1.10$ puesto que es el pH al que se obtiene una mayor sensibilidad en la señal. Este proceso se empleó para desarrollar un método de análisis por voltamperometría diferencial de pulso. La gráfica de calibración se muestra en la figura 7.2.

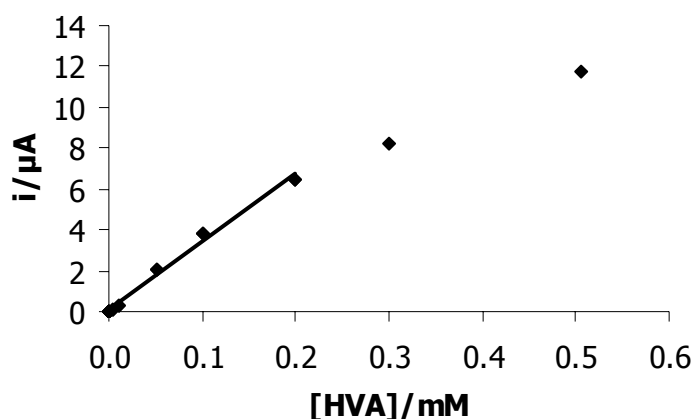


Figura 7.2. (Tablas, T-11).- Gráfica de calibración para HVA obtenida con un electrodo de carbono vitrificado mediante voltametría diferencial de pulso.

Se obtuvo una respuesta lineal con la concentración de analito en el intervalo de concentraciones de 5.0×10^{-7} M a 2.0×10^{-4} M, con un límite de detección de 2.3×10^{-6} M. La ecuación de la recta de calibrado es la siguiente:

$$i/\mu\text{A} = (33.44 \pm 0.53)[\text{HVA}]/\text{mM} + (0.06 \pm 0.02) \quad r = 0.996 \quad n = 8$$

7.3.- Electrodo modificado con polímeros molecularmente impresos para ácido homovanílico.

7.3.1.- Optimización de la respuesta del sensor

Para la preparación del elemento de reconocimiento (polímero impreso) se seleccionaron los monómeros y porógeno óptimos localizados mediante el método computacional basado en cálculos DFT desarrollado en este trabajo (apartados 4.2.6 y 4.2.7), es decir, TFMAA como monómero funcional y tolueno como disolvente. El objetivo es realizar una comprobación experimental de la idoneidad de esta selección. Los resultados se muestran en los sucesivos apartados de este subcapítulo.

A. Efecto del tiempo bajo radiación UV antes de la rotación ($t(UV)$) en la capacidad de reconocimiento de la capa.

En primer lugar, se realizaron pruebas para seleccionar el volumen de mezcla de polimerización óptima a depositar sobre el electrodo para obtener un recubrimiento por rotación (*spin coating*). Puesto que después del recubrimiento se realizó una rotación a 3000 rpm para eliminar el exceso de mezcla precursora, y con menos de 5 μl no se conseguía cubrir totalmente el área del electrodo, se escogió un volumen de 10 μl como óptimo.

Uno de los parámetros a optimizar para construir un sensor mediante la formación de capas de polímero *in situ* sobre la superficie del electrodo es el tiempo que el electrodo modificado es sometido a radiación ultravioleta previamente a la rotación. Este parámetro, denominado en lo

sucesivo como t (UV), es crítico para controlar el espesor de la capa polimérica resultante. De hecho, valores de t (UV) superiores a cinco minutos conducen a capas de polímero demasiado gruesas y la respuesta voltamétrica encontrada en estas condiciones es la de un electrodo muy bloqueado. Esto es debido a que se produce un gran aumento de la viscosidad debido al rápido avance de la polimerización fotoquímica.

Para confirmar esta hipótesis, se sintetizaron diversas capas a diferentes t (UV) midiéndose el espesor de las mismas mediante un microscopio óptico, previamente embutidas en una resina polimérica epoxi y cortadas a la mitad de su diámetro (sección 5.1.2). Posteriormente, algunas capas embutidas en la resina fueron sometidas a un tratamiento de anodización con una fina capa de oro antes de la medida y otras fueron observadas al microscopio sin ningún otro tratamiento, de ahí que en este último caso se observe una tonalidad azulada. Las imágenes obtenidas se muestran en la figura 7.3.

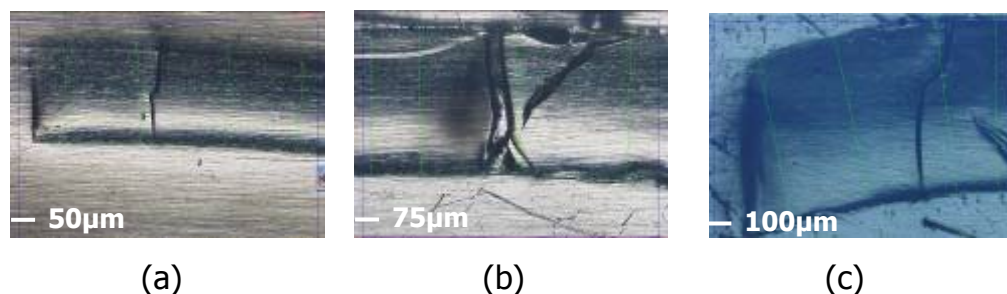


Figura 7.3.- Imágenes de capas de polímero impreso para HVA sintetizadas sobre la superficie de un electrodo de carbono vitrificado a diferentes t (UV) obtenidas por microscopía óptica. (a) 2.5 min; (b) 3 min; (c) 4 min.

Las membranas de polímero acrílico una vez sintetizadas son transparentes y se vuelven ligeramente blanquecinas a medida que se evapora el disolvente. Visualmente, no existen diferencias apreciables entre los electrodos modificados con polímero impreso (MIPE) y no impreso (NIPE).

Las capas tienen una forma ligeramente curvada y además pueden observarse fracturas en la mayor parte de ellas. Estas imágenes confirman lo que es un hecho bien conocido de los polímeros acrílicos: en función de que estén o no en contacto con un disolvente y dependiendo de la naturaleza de éste, sufrirán diferentes procesos de compresión y distensión que conducen finalmente a la generación de fracturas en el polímero. En el experimento, las capas de polímero irremediablemente quedan sin disolvente una vez que se embuten en la resina polimérica, lo que acentúa sin duda los fenómenos anteriores.

El efecto de t (UV) en el espesor de la capa se pone de manifiesto en la figura 7.4.

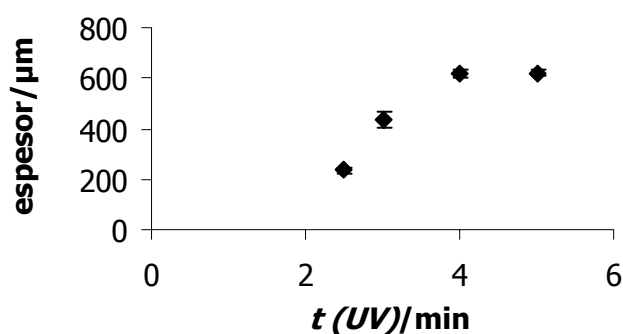


Figura 7.4. (Tablas, T-12).- Efecto de t (UV) en el espesor de la capa.

Como puede verse en la gráfica, el espesor de la capa aumenta con t (UV) hasta 4 minutos. Las capas sintetizadas con tiempos inferiores a 2.5 minutos no se pudieron despegar de la superficie del electrodo sin romperse, lo que impidió que se midiera su espesor con el microscopio. Además de obtener medidas del espesor de la capa, el microscopio óptico permitió estimar el diámetro de los poros de la membrana polimérica. Con este fin, se seleccionó la imagen correspondiente a la superficie de una capa de polímero obtenida con un valor de t (UV) de 3 minutos. En la figura 7.5 se muestra dicha imagen obtenida por microscopía óptica.

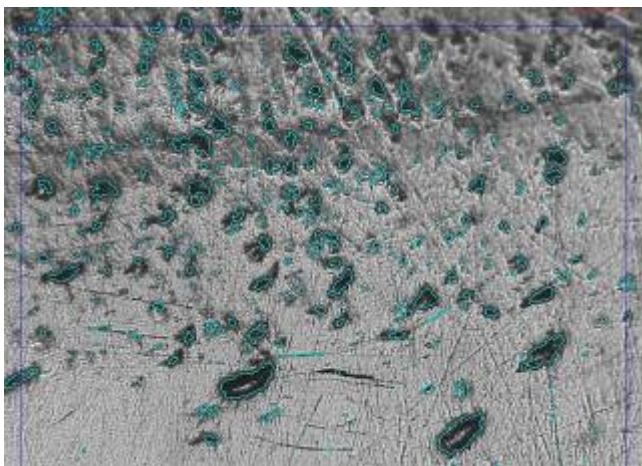


Figura 7.5.- Imagen obtenida por microscopía óptica de la superficie de una capa de polímero impreso sintetizada sobre un electrodo de carbono vitrificado para un $t (UV)$ de 3 min.

En la figura se observa que los poros tienen diversas formas y tamaños. Mediante el programa *Digital Micrograph 3.7.1* se midió el diámetro de un total de 1745 poros que aparecían en dicha imagen. Como diámetro de poro se tomó la mayor distancia entre dos tangentes paralelas en lados opuestos de la sección del poro recogida en la micrografía. El valor promedio en este caso fue de $16 \pm 1 \mu\text{m}$.

Dado que no fue posible despegar del electrodo las capas poliméricas más finas obtenidas con $t (UV)$ menores, las que se esperaba que tuvieran mayor utilidad analítica, no se continuó con este estudio.

Para estudiar el efecto de $t (UV)$ en la capacidad de reconocimiento de la capa, se sintetizaron a partir de la misma mezcla de polimerización electrodos modificados con polímero molecularmente impreso (MIPE) con distintos $t (UV)$. Con cada electrodo se realizó una incubación de 15 minutos en disoluciones de tolueno con concentración creciente de HVA. Después de eliminar el material débilmente adsorbido mediante lavado con acetonitrilo durante cinco segundos, se realizó un barrido diferencial

de pulso utilizando como electrolito de fondo una reguladora de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 exenta de HVA, con un 40% de acetonitrilo, y se midió la intensidad del pico del proceso de oxidación del HVA a un potencial de 850 mV.

En la figura 7.6 se muestran las curvas de respuesta de tres MIPES sintetizados tras un valor de t (UV) de 1, 2 y 3 minutos.

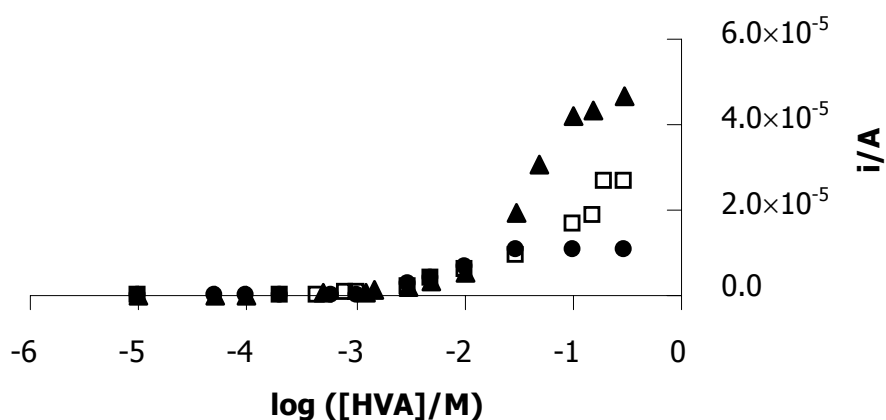


Figura 7.6. (Tablas, T-13).- Curvas de respuesta para tres MIPES sintetizados a distintos t (UV): (\blacktriangle): 1minuto; (\square): 2 minutos; (\bullet): 3 minutos; tras incubaciones de 15 minutos en disoluciones de HVA en tolueno. Las medidas se realizaron en una disolución de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 exenta de HVA, con un 40% de acetonitrilo.

La siguiente figura (7.7) es una ampliación de la figura 7.6 en el rango de concentraciones de HVA más bajas.

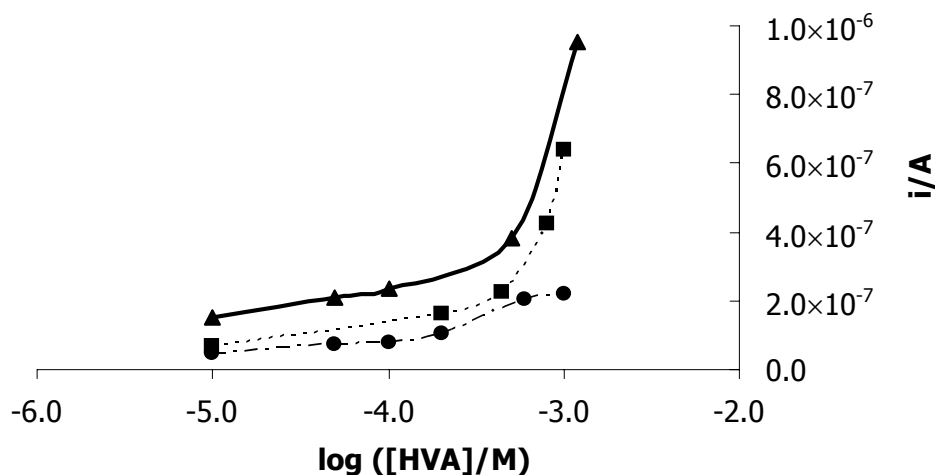


Figura 7.7.- Curvas de respuesta para tres MIPes sintetizados a t (UV) distintos: (▲): 1 minuto; (■): 2 minutos; (●): 3 minutos; para la zona de concentraciones de HVA más bajas.

Podemos observar que a bajos t (UV) el menor espesor de la capa está ligado a una mayor capacidad de reconocimiento de la misma. En consecuencia, el tiempo óptimo de irradiación para producir electrodos modificados con una buena respuesta voltamétrica fue de un minuto.

Además, en todos los casos, la curva de respuesta obtenida al ajustar la concentración de HVA a una escala logarítmica es exponencial, asemejándose a las obtenidas empleando anticuerpos naturales como elementos de reconocimiento, hecho que concuerda con el comportamiento esperado de receptores biomiméticos artificiales.

B. Proporciones en la mezcla de prepolimerización

La proporción entrecruzador: monómero funcional se mantuvo en una relación 1:4 puesto que es una relación comúnmente empleada en la bibliografía. En cuanto al volumen óptimo de disolvente porogénico, en base a estudios previos²⁹² se escogió un volumen de porógeno de 250 μl .

Se seleccionó como medio de incubación el porógeno empleado en la mezcla de polimerización, en nuestro caso tolueno, puesto que hay estudios que indican que se obtiene una mayor capacidad de reconocimiento cuando la etapa incubación se realiza en ese medio²²⁶. Además, el disolvente de incubación idealmente ha de proporcionar un medio apolar que favorezca la formación de puentes de hidrógeno, puesto que es la interacción más fuerte e importante en el reenlace, como demostraron los cálculos DFT realizados (secciones 4.2.6 y 4.2.7).

C. Optimización del disolvente porogénico

Con el fin de comprobar la idoneidad del disolvente porogénico predicho por los métodos teóricos, se modificó un electrodo con una película polimérica sintetizada con acetonitrilo como disolvente porogénico. En este caso no se observó respuesta después de una incubación en las mismas condiciones. También se realizaron calibrados con capas sintetizadas en tolueno y cloroformo en estas condiciones (figura 7.8), obteniéndose un valor promediado para la señal del MIPE veinticinco veces superior cuando se emplea como disolvente porogénico el tolueno. Este hecho experimental confirma los resultados teóricos.

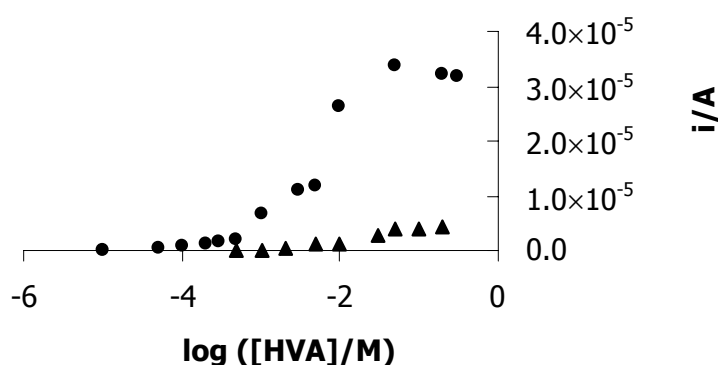


Figura 7.8. (Tablas, T-14).- Representación semi-logarítmica de los calibrados para dos electrodos modificados con polímero molecularmente impreso sintetizados en tolueno (●) y cloroformo (▲) con un valor de t (UV) de dos minutos.

Puesto que la incubación se realizó en tolueno y la medida se realizó en electrolito acuoso, se necesitó introducir una etapa adicional con el fin de eliminar adsorciones inespecíficas, y favorecer la miscibilidad con el medio de medida. Después de varias pruebas de miscibilidad, se observó que el acetonitrilo era el mejor disolvente. Se optimizó también la duración de esta fase. Como muestra la figura 7.9, la señal es bastante estable con el tiempo. En base a este estudio, y por conveniencia operacional, se escogió finalmente un tiempo de 5 segundos.

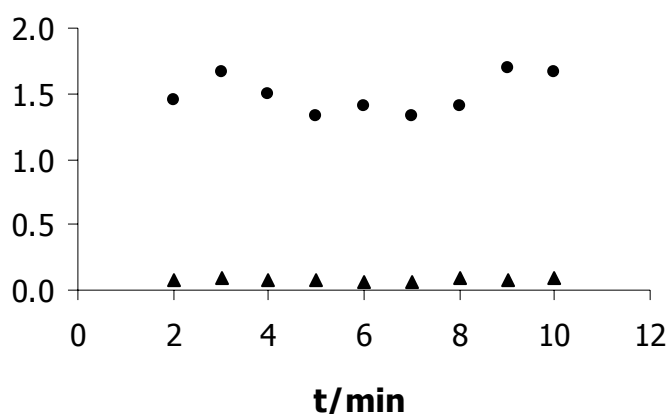


Figura 7.9. (Tablas, T-15).- Variación de la intensidad de corriente para un electrodo modificado con polímero molecularmente impreso (MIPE) (●) y para un electrodo modificado con polímero no impreso (NIPE) (▲) sintetizados a un valor de t (UV) de un minuto frente al tiempo de lavado en acetonitrilo después de una incubación en una disolución de HVA de concentración 5×10^{-5} M en tolueno. Las medidas voltamétricas se realizaron en una disolución de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 exenta de HVA, con un 40% de acetonitrilo.

Para dicho tiempo, la señal obtenida para MIPE es en promedio dieciocho veces mayor que para NIPE.

Se evaluó también la influencia de la señal con el tiempo de equilibrado en el medio de medida (citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10 con un 40% de acetonitrilo), advirtiéndose una ligera disminución de la misma a medida que aumentaba el tiempo de equilibrado en el medio. En consecuencia, se escogió como tiempo óptimo de equilibrado 10 segundos (Tablas, T-16).

D. Optimización del monómero funcional

Con objeto de estudiar la influencia del monómero funcional en la capacidad de reconocimiento del sensor se sintetizaron electrodos modificados con polímero molecularmente impreso (MIPE) y no impreso (NIPE) a un t (UV) de un minuto en tolueno y DMSO empleando TFMAA, MAA y VPY como monómeros funcionales (la baja solubilidad del monómero VPY en tolueno impide la preparación de un MIPE o NIPE en este disolvente, aunque es posible sintetizarlos en DMSO).

En la tabla 7.3 se recogen las intensidades de corriente para MIPE y NIPE cuando se incuban en una disolución de HVA de concentración 5×10^{-5} M en tolueno y en DMSO, el mejor y el peor disolvente porogénico respectivamente, según las predicciones teóricas.

Tabla 7.3.- Intensidades de corriente obtenidas para MIPE y NIPE sintetizados a un t (UV) de un minuto con distinto monómero funcional y disolvente porogénico e incubados en una disolución de HVA de concentración 5×10^{-5} M en tolueno y DMSO.

	$i/\mu A$	
	Tolueno	DMSO
MIPE/TFMAA	1.45	0.86
NIPE/TFMAA	0.07	0.73
MIPE/MAA	1.05	0.51
NIPE/MAA	0.10	0.59
MIPE/VPY	-	0.18
NIPE/VPY	-	No detectado

El monómero funcional óptimo en tolueno es el TFMAA, ya que es el que conduce a una mayor corriente de pico, seguido del MAA. La relación MIPE/NIPE es del orden de 20 veces para TFMAA y de 10 veces para MAA, lo que confirma nuevamente el acierto en la selección del TFMAA como monómero funcional.

Utilizando DMSO como disolvente, el efecto de la impresión molecular se diluye, ya que disminuyen las corrientes de pico para MIPES y aumentan las de los NIPES, reduciéndose las diferencias de comportamiento entre el MIPE y el NIPE para los monómeros estudiados. En consecuencia, el elemento de reconocimiento con mayor afinidad por el HVA es el que se obtiene empleando TFMAA como monómero funcional y tolueno como disolvente porogénico, de acuerdo con las predicciones computacionales.

Por último, la figura 7.10 verifica estas conclusiones. En la misma se representan las curvas de calibración para dos MIPES de TFMAA y MAA sintetizados en tolueno.

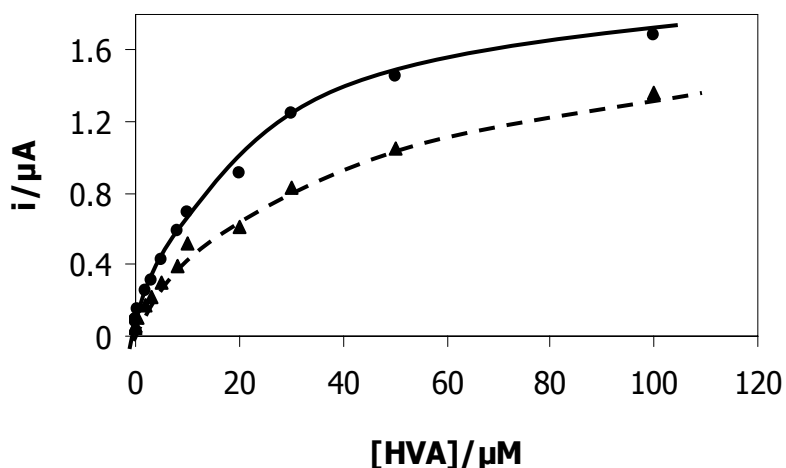


Figura 7.10. (Tablas, T-17).- Gráficas de calibración obtenidas para dos MIPES sintetizados con TFMAA (●) y MAA (▲) en tolueno tras un valor de t (UV) de un minuto. Las medidas voltamétricas se realizaron en una disolución de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 exenta de HVA, con un 40% de acetonitrilo.

E. Efecto de agentes retardantes de la polimerización

Los agentes retardantes o inhibidores de la polimerización, como por ejemplo el polivinilacetato (PVAC) o el isooctano, se han empleado recientemente en la síntesis de películas delgadas de polímeros acrílicos. En la bibliografía se han encontrado tres referencias relativas al efecto de los agentes retardantes o inhibidores de la polimerización en la síntesis de películas delgadas de polímero acrílico³⁰⁸⁻³¹⁰. Según los autores, el empleo de retardantes de la polimerización induce una separación de fases, que en teoría generaría un mayor número de poros en la membrana. Estos poros favorecerían la migración del analito a través de la capa y mejorarían la capacidad de reconocimiento³⁰⁹. Las capas de polímero acrílico que contienen PVAC como agente retardante se sintetizan sobre una superficie de silicio y se realizan ensayos de unión con objeto de determinar la capacidad de reconocimiento del polímero. En estos

estudios, la mezcla óptima que conduce a una mayor capacidad del polímero es la formada por dietilenglicol dimetiléter (diglyme) como disolvente porogénico y un 10% p/v de PVAC. Una posible explicación que se puede dar a este hecho experimental es que la adición de un polímero lineal no reactivo en la mezcla de prepolimerización induce la separación de fases de una forma más agresiva y consecuentemente favorece la formación de poros en el polímero.

Con objeto de comprobar el efecto del agente retardante o inhibidor de la polimerización en la capacidad de reconocimiento del sensor, se sintetizaron electrodos modificados con polímero impreso empleando diglyme como disolvente porogénico con diferentes proporciones de dos tipos de retardantes: isooctano, un retardante no vinílico y de carácter apolar, y polivinilacetato, un retardante polimérico lineal y de carácter polar.

Cabría esperar que el efecto retardante o inhibidor de la polimerización se pusiera de manifiesto mediante un aumento de t (UV). Cuanta mayor fuera la proporción del agente retardante en la mezcla, mayor sería el t (UV) necesario para formar una fina membrana.

Las figuras 7.11 y 7.12 muestran el efecto inhibidor de la polimerización para los dos retardantes ensayados.

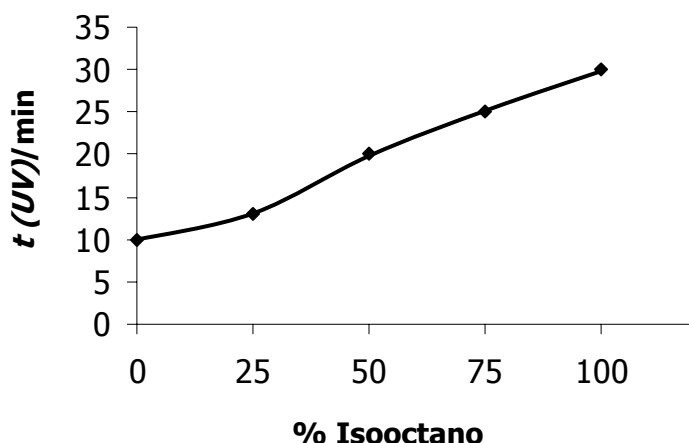


Figura 7.11. (Tablas, T-18).- Influencia del porcentaje de isooctano en el t (UV) necesario para iniciar la polimerización.

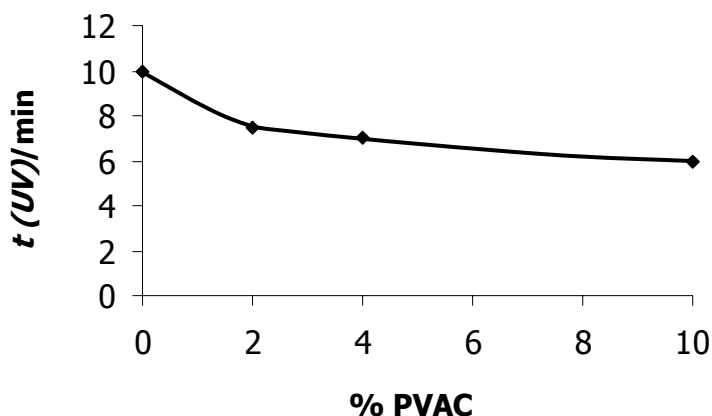


Figura 7.12. (Tablas, T-19).- Influencia del porcentaje peso/volumen de polivinilacetato en el $t (UV)$ necesario para iniciar la polimerización.

El empleo de isooctano como retardante de la polimerización conduce a una variación prácticamente lineal de $t (UV)$ con el porcentaje de retardante. A medida que aumenta el porcentaje de isooctano en la mezcla, $t (UV)$ aumenta, desde los diez minutos para una mezcla en diglyme puro sin inhibidor, hasta los treinta minutos, cuando el disolvente es únicamente isooctano.

Sin embargo, el empleo del polivinilacetato como agente retardante, conduce a un comportamiento distinto. A medida que el porcentaje de inhibidor aumenta, $t (UV)$ disminuye, justo lo contrario que ocurría con el isooctano. Este hecho, lejos de contradecir la idea de que el PVAC inhibe la polimerización, lo que refuerza es una evidencia experimental: a medida que aumenta el porcentaje de PVAC, la mezcla se hace visiblemente más densa, requiriendo menor $t (UV)$ a medida que aumenta el porcentaje de PVAC.

Cuando se realiza la experiencia con varias capas sintetizadas en diglyme como disolvente porogénico con diferentes proporciones de PVAC y se incuban en una disolución de HVA 4.76×10^{-4} M en diglyme, se observa que lejos de aumentar la capacidad de reconocimiento del sensor

con un aumento de la concentración de inhibidor, ésta disminuye ligeramente como se demuestra en la figura 7.13.

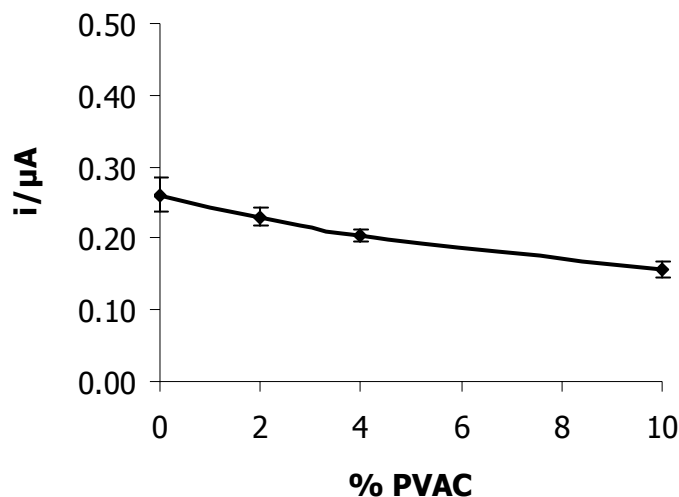


Figura 7.13. (Tablas, T-20).- Variación de la intensidad de corriente con el porcentaje peso/volumen de polivinilacetato para una capa sintetizada con diglyme como disolvente porogénico. La incubación se realizó en una disolución de HVA de concentración 4.76×10^{-4} M en diglyme.

En la bibliografía encontrada se emplearon porcentajes de PVAC hasta de un 10 % p/v. En nuestro caso, fueron ensayados porcentajes superiores, sin embargo, la difícil solubilidad del PVAC en diglyme y tolueno y la gran densidad que adquiriría la mezcla de polimerización no permitió sintetizar capas finas con adecuadas características de reconocimiento.

Un comportamiento similar al PVAC se observó cuando se sintetizaron capas en diglyme con diferentes proporciones del otro retardante estudiado, isooctano, y se incubaron en una disolución de HVA de concentración 4.76×10^{-4} M en diglyme. Al igual que con PVAC, la intensidad de la señal disminuye a medida que aumenta el porcentaje de retardante en la mezcla de polimerización (figura 7.14).

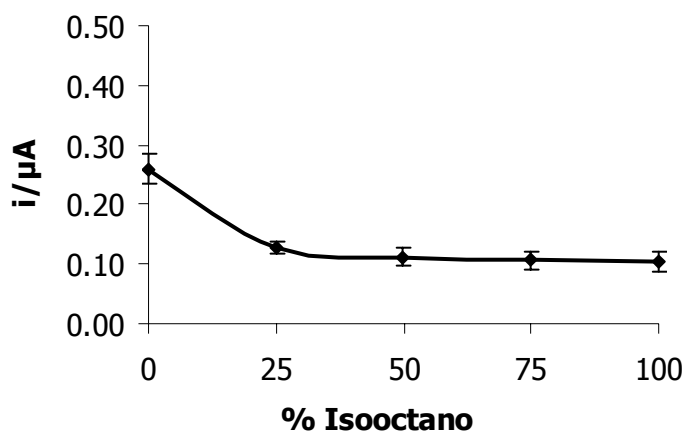


Figura 7.14. (Tablas, T-21).- Variación de la intensidad de corriente con el porcentaje de isooctano para una capa sintetizada con diglyme como disolvente porogénico. La incubación se realizó en una disolución de HVA de concentración 4.76×10^{-4} M en diglyme.

Para terminar de confirmar que efectivamente el empleo de retardantes de la polimerización no mejora la capacidad de reconocimiento del sensor independientemente del disolvente porogénico empleado, se realizó un experimento paralelo al anterior, en el que se sintetizaron membranas poliméricas con diferente proporción de isooctano empleando como disolvente porogénico tolueno en lugar de diglyme. La incubación se realizó en una disolución de HVA de concentración 4.76×10^{-4} M en tolueno. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.15.

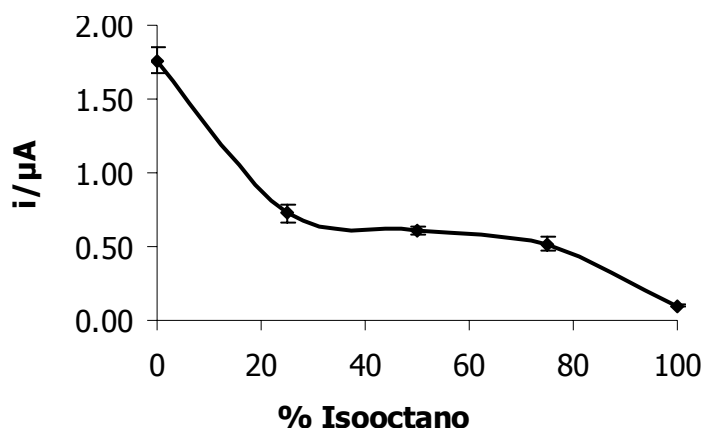


Figura 7.15. (Tablas, T-22).- Variación de la intensidad de corriente con el porcentaje de isooctano para una capa sintetizada con tolueno como disolvente porogénico. La incubación se realizó en una disolución de HVA de concentración 4.76×10^{-4} M en tolueno.

Nuevamente, se observa la misma tendencia comentada anteriormente: una disminución de la intensidad de corriente a medida que aumenta el porcentaje de retardante en la mezcla. Esto nos permite afirmar que en este caso el efecto del retardante en la membrana lejos de aumentar la capacidad de enlace de la misma, la disminuye. Estos datos indican también que la sensibilidad de la medida depende de la capacidad de preconcentración de HVA en el polímero durante la etapa de incubación. Cuando se reduce esta capacidad porque el polímero sintetizado tiene una estructura muy abierta (si se ha usado más disolvente porogénico o retardantes) se preconcentra una cantidad menor y disminuye la señal.

Por último, se puede afirmar que la utilización de tolueno como disolvente porogénico aumenta la sensibilidad de la capa en más de tres veces con respecto a una membrana sintetizada con diglyme. Con el fin de asegurar esta conclusión se llevó a cabo un ensayo en el que se sintetizaron capas de polímero en diglyme y tolueno como disolvente porogénico incubando en diferentes disolventes de incubación. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 7.16.

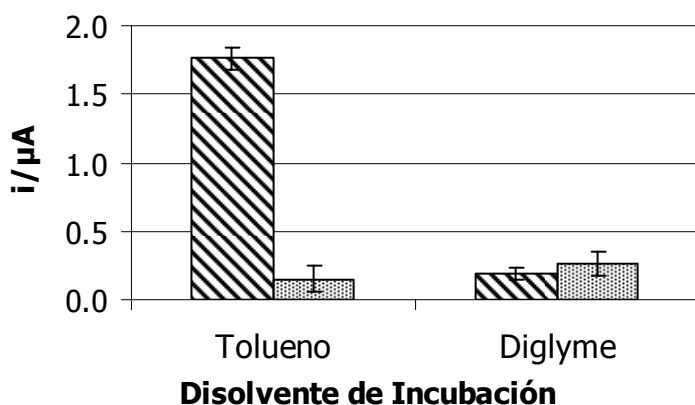


Figura 7.16. (Tablas, T-23).- Variación de la intensidad de corriente con la naturaleza del disolvente de incubación para capas sintetizadas en tolueno (▨) y capas sintetizadas en diglyme (▩), respectivamente. La incubación se realizó en una disolución de HVA de concentración 4.76×10^{-4} M.

Como se puede apreciar, las capas sintetizadas e incubadas en tolueno presentan una capacidad de enlace cuatro veces mayor con respecto a capas sintetizadas en tolueno pero incubadas en diglyme. Por otro lado, las películas poliméricas sintetizadas e incubadas en diglyme presentan idéntico comportamiento: mayor retención del analito cuando la incubación se realiza en el disolvente porogénico.

Se comprobó por tanto un "efecto de memoria", obteniéndose mayores capacidades de reconocimiento del sensor cuando las membranas se sintetizan e incuban en el mismo disolvente.

En definitiva, la incorporación de agentes retardantes en la mezcla de polimerización lejos de mejorar las capacidades de enlace del polímero, las empeora, por lo que no se emplearán en el futuro.

F. Optimización del tiempo de incubación

La figura 7.17 muestra cómo varía la intensidad de corriente de un electrodo modificado con polímero impreso (MIPE) con el tiempo de incubación. Puesto que no se observó un aumento de señal apreciable por encima de 15 minutos para una concentración de HVA determinada, el tiempo de incubación en sucesivas experiencias se fijó en ese valor.

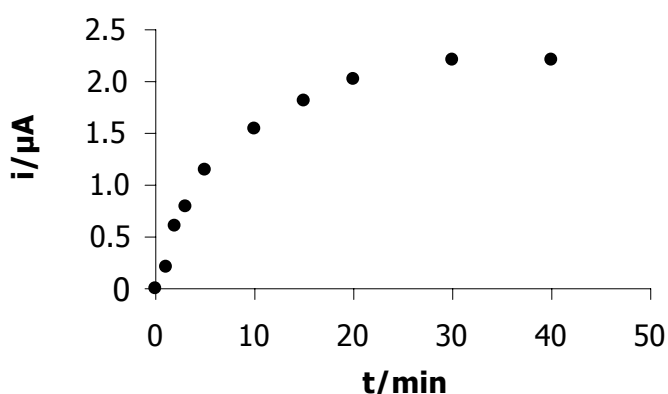


Figura 7.17. (Tablas, T-24).- Variación de la intensidad de corriente de un MIPE sintetizado a un t (UV) de un minuto con el tiempo de incubación en tolueno para una concentración de HVA de 5×10^{-5} M.

G. Selección del disolvente de lavado

Se ensayaron distintos disolventes con el fin de regenerar la fase sensora. Se encontró que 10 minutos de lavado en una mezcla de dioxano con un 20% v/v de metanol después de cada incubación fue suficiente para registrar fondos completamente limpios en el barrido de potenciales.

7.3.2.- Relación de señales MIPE/NIPE en las condiciones seleccionadas

En la figura 7.18 se presenta la señal voltamétrica obtenida para un electrodo modificado con polímero molecularmente impreso (MIPE) y para un electrodo de control o modificado con polímero no impreso (NIPE) sintetizados en tolueno para un t (UV) de un minuto. Puesto que los dos electrodos recibieron el mismo tratamiento, se puede constatar que la diferencia de respuesta observada se debe a la presencia de HVA en la mezcla de polimerización, y al éxito del proceso de impresión molecular.

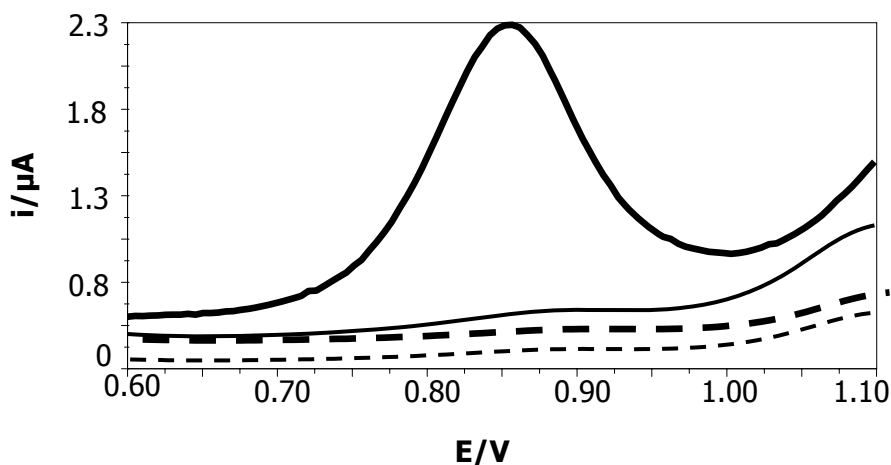


Figura 7.18.- Voltamperograma diferencial de pulso obtenido con un MIPE (línea de trazo grueso) y un NIPE (línea de trazo fino) en una reguladora de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 exenta de HVA con un 40% de acetonitrilo, previa etapa de incubación en una disolución de HVA de concentración 5×10^{-5} M en tolueno. Las líneas de trazo discontinuo corresponden a los fondos obtenidos en cada caso.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede confirmar que tanto la selección a priori de los monómeros y el porógeno utilizados en el polímero, como las condiciones experimentales utilizadas conducen a un eficaz elemento de reconocimiento en el sensor.

7.3.3.- Estudio electroquímico de la permeabilidad de las capas poliméricas con electrodo de disco rotatorio

A. Fundamento

En la bibliografía se encontraron varios modelos que describen el transporte de materia de especies en disolución en superficies electródicas a través de capas de polímero³¹¹⁻³¹⁸.

Los procesos de reducción y oxidación de especies en disolución a través de electrodos modificados con polímeros en intervalos de potencial donde el polímero no es electroactivo han sido abordados teóricamente mediante dos modelos distintos. Ambos comienzan tratando el polímero como una capa finita en contacto con una región semi-infinita, que es la disolución.

Gueshi, Tokuda y Matsuda³¹⁹ propusieron el **modelo de agujeros o pinhole model**. En este modelo, el polímero se considera como una capa no porosa en la superficie electródica que contiene como defectos muchos agujeros pequeños. El transporte de masa de las especies en disolución a la superficie electródica tiene lugar por difusión a través de dichos canales llenos de disolución.

El modelo denominado **modelo de membrana**, se basa en la suposición de que se establece un rápido equilibrio de reparto en la interfase polímero/disolución, por lo que es el que mejor se adapta a las membranas poliméricas preparadas en este trabajo. El modelo ha sido desarrollado para cronoamperometría por Peerce y Bard³²⁰ y para medidas amperométricas con electrodo de disco rotatorio por Gough y Leypoldt³²¹. Estos últimos autores plantearon un modelo basado en la ecuación de Koutecky-Levich. Las ecuaciones que propusieron fueron las siguientes:

$$i_d = i_L \frac{I}{I + \frac{P_s}{P_m}} \quad [7.1]$$

donde i_d representa la corriente de difusión, i_L la corriente límite de Levich, y P_s y P_m representan la permeabilidad de la disolución y la membrana, respectivamente.

La corriente de Levich se calcula según la ecuación:

$$i_L = 0.62nFAD^{2/3}\nu^{-1/6}C_B\omega^{1/2} \quad [7.2]$$

Donde n es el número de electrones intercambiados durante la reacción en el electrodo, F es la constante de Faraday (96487 Culombios/mol), A el área de la superficie electródica (en cm^2), D el coeficiente de difusión de las especies en disolución (en cm^2/s), ν la viscosidad cinemática de la disolución ($1.0038 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{s}$ a 20°C), C_B la concentración de especies reaccionantes en la disolución (en mol/cm^3) y ω la velocidad de rotación del electrodo rotatorio (en rad/s).

La permeabilidad de la disolución se expresa como:

$$P_s = \frac{D}{\delta_d} \quad [7.3]$$

Donde δ_d , el espesor de la capa de difusión en la interfase líquida de la membrana y que se calcula como:

$$\delta_d = 1.6D^{1/3}\nu^{1/6}\omega^{-1/2} \quad [7.4]$$

La permeabilidad de la membrana se deduce de la expresión:

$$P_m = \frac{\alpha D_m}{\delta_m} \quad [7.5]$$

Donde α es el coeficiente de reparto, D_m el coeficiente de difusión de las especies reaccionantes en la membrana y δ_m es el espesor de la membrana. Dividiendo la corriente límite por el área superficial se obtiene:

$$j_L = \frac{i_L}{A} = 0.62nF D^{2/3} \nu^{-1/6} C_B \omega^{1/2} \quad [7.6]$$

Y sustituyendo las ecuaciones [7.4]-[7.6] en la ecuación [7.1] se obtiene:

$$j_d = \frac{i_d}{A} = 0.62nF D^{2/3} \nu^{-1/6} C_B \omega^{1/2} \times \left[1 + \frac{D / (1.6 D^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2})}{\alpha \left(\frac{D_m}{\delta_m} \right)} \right]^{-1} \quad [7.7]$$

Donde j_d es la densidad de corriente de difusión. Debido a la formación del polímero sobre la superficie del electrodo no toda el área superficial estará disponible para dar lugar a la reacción, por lo que a priori no podemos calcular j_d .

Empleando la relación entre i_d e i_L (ecuación [7.1]) y teniendo en cuenta la ecuación [7.3] y [7.4] llegamos a la ecuación siguiente:

$$i_L = i_d \left[1 + \frac{D / (1.6 D^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2})}{P_m} \right] \quad [7.8]$$

Donde i_d es la corriente de difusión que se mide, D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en disolución, ν es la viscosidad

cinemática del medio y ω es la velocidad de rotación. Todos estos parámetros son conocidos excepto A , el área de la superficie electrodo y P_m , la permeabilidad de la capa.

Dividiendo la expresión [7.8] por el área superficial se obtiene una expresión para j_L [7.9], que relaciona la densidad de corriente límite con la corriente de difusión:

$$j_L = \frac{i_d}{A} \left[1 + \frac{D / (1.6 D^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2})}{P_m} \right] \quad [7.9]$$

En el método propuesto por J.I. Reyes De Corcuera y colaboradores³²², se empleó un procedimiento iterativo para calcular simultáneamente tanto el área superficial como la permeabilidad de la capa.

Para ello, se midió i_L a diferentes velocidades de rotación para un electrodo de carbono vitrificado sin modificar e i_d para un electrodo de carbono vitrificado modificado con una capa polimérica. Con el valor de área obtenido para el electrodo de carbono vitrificado sin modificar (calculada a partir de la ecuación de Levich o Cottrell) se calculó j_{Lbare} para cada velocidad de rotación. Para el caso de un electrodo modificado con membrana polimérica es necesario emplear un método iterativo, por lo que se utilizó la función *Solver* de Microsoft Excel 2003. Inicialmente, se dio un valor de siembra para el área superficial A , y para la permeabilidad de la membrana P_m en la ecuación [7.9], de forma que se pudo obtener un valor estimado denominado j_{Lcalc} para cada velocidad de rotación.

Se tomaron los logaritmos decimales de j_{Lbare} y j_{Lcalc} y se calculó RSS (la suma del cuadrado de las diferencias entre los valores $\log(j_{Lbare})$ y $\log(j_{Lcalc})$ para cada velocidad de rotación) y TSS (la suma del cuadrado de las diferencias entre $\log(j_{Lbare})$ para cada velocidad de rotación y la media de $\log(j_{Lbare})$). La convergencia del proceso iterativo tiene lugar cuando se

minimiza la relación RSS/TSS para que R^2 ($1-RSS/TSS$) alcance un valor próximo a 1.

Como se observa en la ecuación [7.6], j_L es lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de rotación y es independiente de la capa. De este modo, una vez que se da un valor de siembra al área superficial, A , y se calcula $j_{L,calc}$, este valor diferirá de la densidad de corriente real $j_{L,barer}$ medida con un electrodo de carbono vitrificado sin modificar en un factor constante, confirmando que el valor de P_m es correcto.

Otro método alternativo para calcular P_m y A es a través de la ecuación de Koutecky-Levich (expresión obtenida a partir de la reordenación de los términos de la ecuación [7.7]).

$$\frac{I}{i_d} = \frac{I}{nFAC_B P_m} + \frac{I}{0.62nFAD^{2/3} \nu^{-1/6} C_B} \frac{I}{\omega^{1/2}} \quad [7.10]$$

De la ordenada en el origen del ajuste i_d^{-1} frente a $\omega^{-1/2}$, puede determinarse el producto de A por P_m y A puede calcularse de la pendiente. Los dos sumandos de la ecuación representan respectivamente las velocidades de difusión del soluto a través de la membrana y a través de la capa de Levich en disolución.

Si $D^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} \ll P_m$ (el caso de una capa muy fina o de un elevado valor de P_m), la difusión a través de la capa de Levich es la más lenta de las dos y un ajuste i_d^{-1} frente a $\omega^{-1/2}$ es lineal con ordenada en el origen igual a cero (ecuación de Levich). Si la difusión a través de la membrana es más lenta, de la ordenada en el origen puede calcularse P_m .

Se pueden extraer importantes conclusiones a partir de la ecuación de Koutecky-Levich:

1. La pendiente de la ecuación debe conducir al mismo valor de D para un electrodo de carbono vitrificado sin modificar en electrodo rotatorio, independientemente del valor de C_B o espesor de la membrana, δ_m .
2. La ordenada en el origen debería ser inversamente proporcional a C_B y directamente proporcional a δ_m .

La principal limitación de este método es que requiere de una extrapolación de los datos a partir de la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de Koutecky-Levich para obtener A y P_m , mientras que el método propuesto por J. I. Reyes De Corcuera y colaboradores permite calcular simultáneamente los dos parámetros, aunque sea preciso cierto trabajo computacional.

A continuación, se mostrarán diversos estudios que tienen por objeto estudiar el proceso de electrodo y comparar los resultados obtenidos tanto aplicando el método iterativo como el método de Koutecky-Levich.

B. Caracterización del proceso de electrodo

En primer lugar se estudió el proceso anódico principal del HVA. El estudio consistió en observar la influencia de la velocidad de barrido de potenciales sobre las corrientes de pico a una concentración fija de HVA. Para ello, se sintetizó un electrodo modificado con polímero molecularmente impreso empleando TFMAA como monómero funcional y tolueno como disolvente porogénico con un valor de t (UV) de un minuto. Tras un período de incubación de 15 minutos en una disolución de HVA 0.1 M en tolueno, se realizó un barrido de potencial lineal en una disolución reguladora de citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10 exenta de HVA y

con un 40% de acetonitrilo a una velocidad de barrido de potencial entre 5 y 1000 mv/s. Posteriormente se lavó la capa polimérica con dioxano con un 20% v/v en metanol y se realizó una nueva incubación y medida a otra velocidad de barrido distinta. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 7.19.

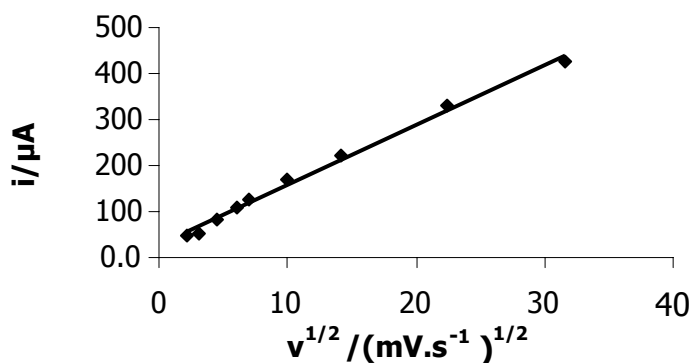


Figura 7.19. (Tablas, T-25).- Variación de la intensidad de pico anódico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potenciales a una concentración de HVA de 0.1 M en tolueno.

Los datos experimentales se ajustan a la ecuación que se presenta a continuación:

$$i/\text{A}=1.31\times 10^{-5} v^{1/2}/(\text{mV/s})^{1/2}+2.64\times 10^{-5} \quad r=0.997 \quad n=9$$

Se demuestra una variación lineal de la intensidad de pico anódico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potenciales, lo que indica que el proceso de electrodo está controlado por la difusión de la especie electroactiva a la superficie electródica.

Puesto que las medidas están realizadas en una disolución exenta de HVA, esa difusión tiene lugar dentro de la capa polimérica impresa para HVA, donde se preconcentró de manera efectiva este compuesto.

C. Cálculo del área efectiva del electrodo y coeficiente de difusión de HVA, cloruro de hexaaminrutenio (III) y ferricianuro potásico en disolución

El área superficial del electrodo se puede calcular de forma independiente mediante la pendiente de la ecuación de Koutecky-Levich que vimos anteriormente [7.10] o mediante la ecuación de Cottrell [7.11], que describe la variación de la intensidad de corriente de difusión con el tiempo:

$$i_d(t) = \frac{nFA(D)^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} C_0 \quad [7.11]$$

Donde:

n = número de electrones involucrados en la reacción

F = constante de Faraday (96487 Culombios/mol)

A = área efectiva del electrodo, en cm^2

D = coeficiente de difusión de las especies en disolución, en cm^2/s

t = tiempo en segundos

C_0 = concentración inicial de la especie electroactiva, en mol/cm^3

En esta ecuación todas las variables son conocidas excepto A y D . Existen valores tabulados de D para diversas especies, entre ellas, la del par reversible ferro/ferricianuro potásico³²³ como se recoge en la tabla 7.4.

Tabla 7.4.- Valores tabulados de coeficientes de difusión en disolución para el par reversible ferro/ferricianuro potásico de concentración 1 mM en KCl 0.1 M a 25°C³²³.

Especie en disolución/ KCl 0.1 M	D (cm²/s)
Ferrocianuro potásico	$(6.50 \pm 0.02) \times 10^{-6}$
Ferricianuro potásico	$(7.62 \pm 0.02) \times 10^{-6}$

Si se realiza una cronoamperometría, es decir, una monitorización de la intensidad de corriente de difusión con el tiempo a potencial constante para ferricianuro potásico en las mismas condiciones en las que está tabulado su coeficiente de difusión, de la pendiente de la recta i_d vs. $t^{-1/2}$ se extrae el área efectiva del electrodo, A . Una vez conocida el área efectiva del electrodo modificado o sin modificar, se pueden realizar cronoamperometrías con diversas especies en disolución y conocer su coeficiente de difusión.

Para realizar el cálculo del área efectiva y de los coeficientes de difusión de las especies en disolución para un electrodo sin modificar se emplearon tres moléculas de diferentes tamaños y cargas: la propia molécula molde, ácido homovanílico (neutro), cloruro de hexaaminrutenio (III) (cargado positivamente) y ferricianuro potásico (cargado negativamente). La selección del cloruro de hexaaminrutenio (III) y del ferricianuro potásico se realizó atendiendo a su comportamiento reversible con objeto de evitar el envenenamiento del electrodo por generación de productos de oxidación o reducción durante las amperometrías.

Se prepararon patrones puros de HVA, cloruro de hexaaminrutenio (III) y ferricianuro potásico de concentración 1×10^{-3} M en una reguladora de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 con un 40% de acetonitrilo y se realizaron

las correspondientes amperometrías de 5 segundos a un potencial constante de: +0.1 V para ferricianuro potásico, -0.40 V para cloruro de hexaaminrutenio (III) y +1.10 V para HVA. (Previamente se realizaron cronoamperometrías con ferricianuro potásico de concentración 1×10^{-3} M en KCl 0.1 M al mismo potencial y tiempo de aplicación con objeto de calcular el área efectiva del electrodo). Los valores de área del electrodo y coeficientes de difusión en disolución de las especies estudiadas se recogen en la tabla 7.5.

Tabla 7.5.- Área efectiva del electrodo de carbono vitrificado sin modificar y coeficientes de difusión en disolución para HVA, cloruro de hexaaminrutenio (III) y ferricianuro potásico en una reguladora de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 con un 40% de acetonitrilo.

Especie en disolución Citrato/HCl 0.1M	D (cm²/s)	Área efectiva (cm²)
Ácido homovanílico	$(7.21 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.071 ± 0.001
Cloruro de hexaaminrutenio (III)	$(7.94 \pm 0.18) \times 10^{-6}$	
Ferricianuro potásico	$(7.63 \pm 0.02) \times 10^{-6}$	

D. Estudio de la permeabilidad de la capa

El cálculo del área efectiva y de los coeficientes de difusión de las especies anteriores en disolución se realizó con un electrodo de carbono vitrificado modificado con polímero impreso (MIPE) y no impreso (NIPE) acoplado a un dispositivo rotatorio de velocidad de rotación controlada que varía desde 500 hasta 3000 rpm.

En la figura 7.20 se muestra un ejemplo de los cronoamperogramas obtenidos para un MIPE en presencia de HVA a tres niveles de concentración distintos: 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M y 2.5×10^{-4} M para un valor de t (UV) de un minuto.

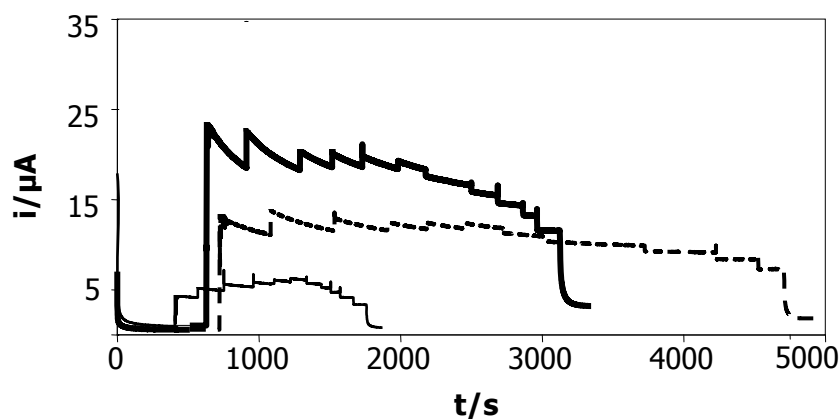


Figura 7.20.- Cronoamperogramas obtenidos en un medio de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 con un 40% de acetonitrilo para un MIPE sintetizado tras un minuto de t (UV) en presencia de tres niveles de concentración de HVA: 1×10^{-3} M (línea de trazo grueso), 5×10^{-4} M (línea de trazo discontinuo) y 2.5×10^{-4} M (línea de trazo fino).

En todos los casos, tanto para MIPes como para NIPes, cuando se representa el inverso de la intensidad de corriente de difusión frente al inverso de la raíz cuadrada de la velocidad de rotación se obtiene un ajuste lineal, cuya tendencia se muestra en la figura 7.21.

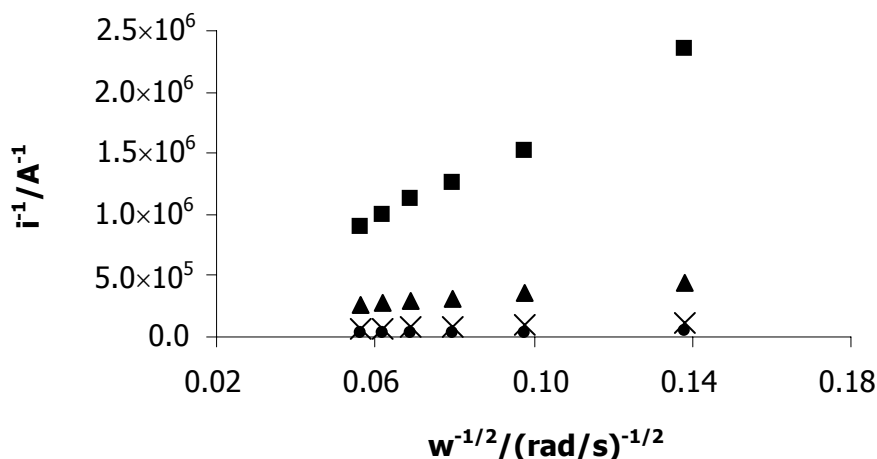


Figura 7.21. (Tablas, T-26).- Representación del inverso de las intensidades de corriente de difusión frente al inverso de la raíz cuadrada de la velocidad de rotación para tres MIPEs de la misma composición sintetizados a tres t (UV) distintos: (▲) 3 minutos; (×) 1 minuto y (●) 30 segundos) y para un NIPE sintetizado a 180 segundos (■), para una concentración de HVA de 1×10^{-3} M.

Como cabía esperar, a medida que t (UV) aumenta, el espesor de la capa aumenta, y como consecuencia, las intensidades de corriente registradas en presencia de HVA, disminuyen, lo que se traduce en inversos de corriente de difusión mayores. Por otro lado, el NIPE presenta menores intensidades de corriente que el MIPE para el mismo t (UV) a las velocidades de rotación estudiadas.

E. Comportamiento diferencial MIPE/NIPE

En la figura 7.22 se observan los diferentes cronoamperogramas obtenidos para un MIPE y un NIPE sintetizados en idénticas condiciones para un valor de t (UV) de un minuto en presencia de la molécula molde HVA.

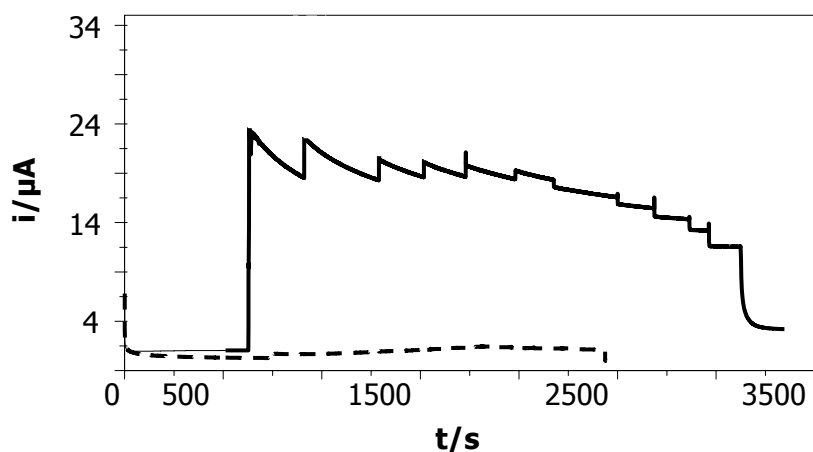


Figura 7.22.- Cronoamperogramas obtenidos en un medio de citrato/HCl 0.1 M y $\text{pH}=1.10$ para MIPE (línea continua) y NIPE (línea discontinua) sintetizados con un valor de t (UV) de un minuto en presencia de HVA de concentración 5×10^{-4} M.

Como puede observarse, las intensidades de corriente para el MIPE son superiores a las observadas con el NIPE en presencia de HVA. Este hecho diferencial no ocurre cuando los electrodos se encuentran en presencia de ferricianuro potásico o cloruro de hexaaminrutenio (III) (figuras 7.23 y 7.24), lo que podría indicar la formación de sitios de unión específicos para HVA en el MIP, inexistentes en el NIP.

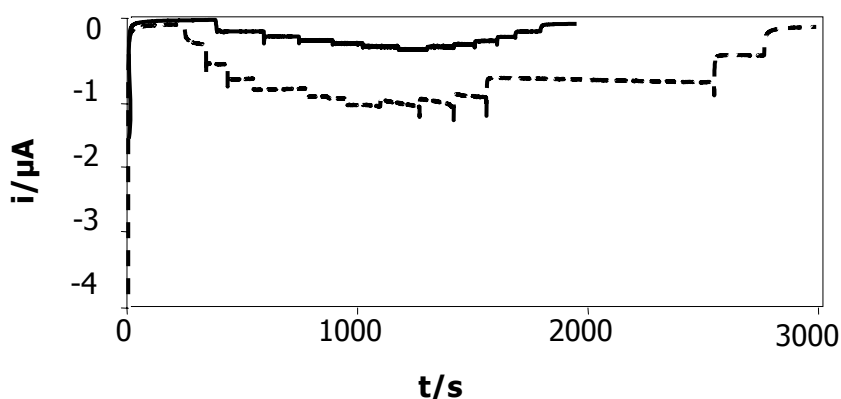


Figura 7.23.- Cronoamperogramas obtenidos en un medio de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 para MIPE (línea continua) y NIPE (línea discontinua) sintetizados con un valor de t (UV) de un minuto en presencia de ferricianuro potásico de concentración 1×10^{-3} M.

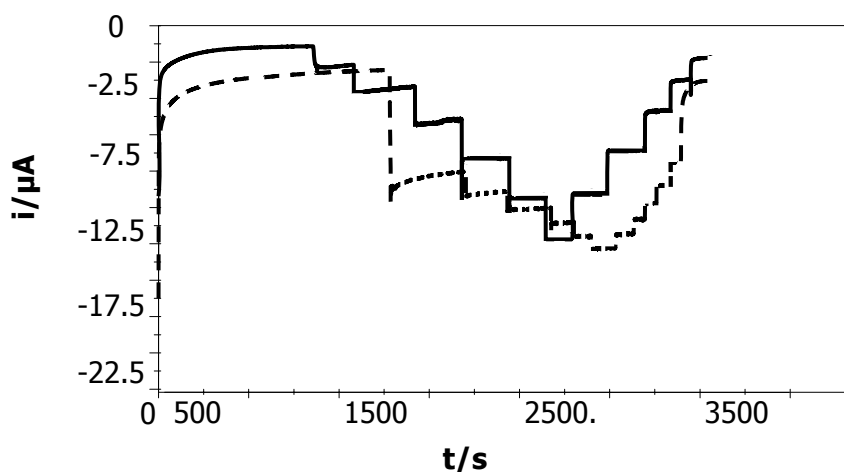


Figura 7.24.- Cronoamperogramas obtenidos en un medio de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 para MIPE (línea continua) y NIPE (línea discontinua) sintetizados con un valor de t (UV) de un minuto en presencia de cloruro de hexaminruteno (III) de concentración 1×10^{-3} M.

Empleando los dos métodos descritos con anterioridad (Koutecky-Levich y procedimiento iterativo) se calcularon las permeabilidades de las capas, así como las áreas efectivas de cada una de ellas. En la tabla 7.6 se comparan los datos obtenidos para un MIPE y un NIPE sintetizados tras un valor de t (UV) de un minuto para las tres moléculas estudiadas.

Tabla 7.6.- Comparación de las permeabilidades de MIPE y NIPE sintetizados en las mismas condiciones para un valor de t (UV) de un minuto según los dos métodos estudiados (Koutecky-Levich y procedimiento iterativo).

Especie en disolución	P_m (itera) $\times 10^{-5}$ (cm ² /s)		P_m (Koute) $\times 10^{-5}$ (cm ² /s)		A (cm ²)	
	MIPE	NIPE	MIPE	NIPE	MIPE	NIPE
HVA	1.60± 0.31	0.63± 0.04	4.96± 0.21	0.27± 0.03	0.011±0.003	0.013±0.002
Ferricianuro potásico	0.23± 0.03	0.31± 0.01	0.47± 0.01	0.12± 0.02		
Cloruro de Hexaamin rutenio(III)	4.18± 0.41	1.14± 0.21	9.23± 0.29	0.34± 0.02		

A la vista de los resultados, se puede afirmar que las áreas efectivas de MIPE y NIPE son prácticamente iguales (considerando el error experimental). HVA tiene permeabilidades superiores al ferricianuro potásico, pero por otro lado inferiores al cloruro de hexaaminrutenio (III). Si recordamos la ecuación [7.5], la permeabilidad es la relación entre el coeficiente de difusión y el espesor de la capa, todo ello multiplicado por el coeficiente de reparto. Puesto que los coeficientes de difusión de las moléculas estudiadas son similares y el espesor también ya que las capas se sintetizan en las mismas condiciones y el mismo t (UV) (un minuto), el único factor al que se le puede atribuir tan diferente comportamiento es al coeficiente de reparto.

HVA presenta un coeficiente de reparto mayor en la capa polimérica que el ferricianuro potásico y menor que el cloruro de hexaaminrutenio (III). El hecho de que la permeabilidad del cloruro de hexaaminrutenio (III) sea superior al HVA en la capa puede fundamentarse en las

características de intercambiador iónico del polímero. En este caso concreto, los sitios de unión del polímero están formados por ácidos carboxílicos y como es bien conocido, los ácidos carboxílicos actúan como intercambiadores catiónicos débiles. De este modo, resulta una hipótesis factible pensar que el polímero pueda intercambiar su catión por el catión hexaaminrutenio (III) y así conducir a un mayor coeficiente de reparto en la capa, lo que explicaría la mayor permeabilidad observada tanto para el MIPE como para el NIPE.

Estudiando de forma comparativa ambos métodos (procedimiento iterativo y Koutecky-Levich), ambos demuestran una misma tendencia en cuanto al comportamiento diferencial MIPE/NIPE para las distintas moléculas. Los valores de permeabilidad por el método de Koutecky son ligeramente distintos a los obtenidos por el método iterativo, hecho que aparece igualmente confirmado en otras publicaciones³²².

Se puede observar también que la permeabilidad aparente en la capa es un orden de magnitud mayor que los coeficientes de difusión calculados para HVA en disolución. Este hecho refuerza la hipótesis de que existe un mecanismo de reparto entre la disolución y la película polimérica.

En base a este estudio, se podría concluir que el mecanismo de respuesta del sensor implicaría la preconcentración del HVA en la capa polimérica, seguida de difusión del mismo desde los sitios de unión a la superficie del electrodo.

7.3.4.- Calibración

La respuesta del sensor a la concentración de HVA en el medio de incubación se muestra en la figura 7.25.

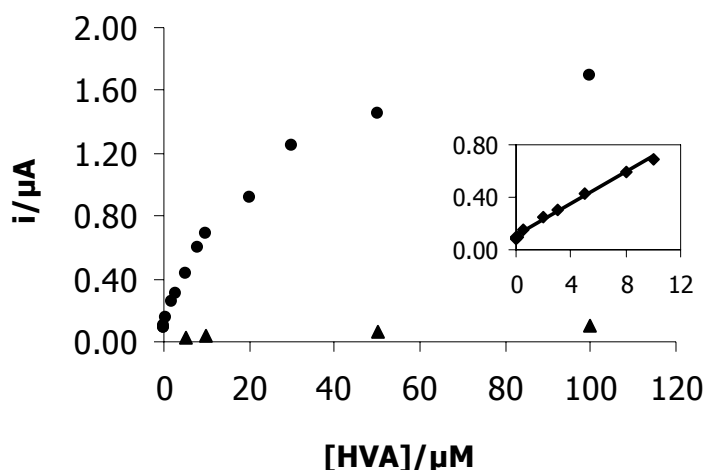


Figura 7.25. (Tablas, T-27).- Gráficas de calibración obtenidas mediante voltametría diferencial de pulso para MIPE (●) y NIPE (▲) sintetizados tras un valor de $t(UV)$ de un minuto. El registro voltamétrico se realizó en una reguladora de citrato/HCl 0.1 M exenta de HVA, con un 40% de acetonitrilo y previa etapa de incubación en una disolución de HVA en tolueno.

El rango lineal se extiende desde una concentración de 1.0×10^{-8} M hasta una concentración de 1.0×10^{-5} M. En este intervalo la ecuación de la recta se describe como:

$$i/A = (0.061 \pm 0.002) [\text{HVA}]/\text{M} + (1.0 \pm 0.1) \times 10^{-7} \quad r=0.996 \quad n=9$$

La preconcentración conseguida con el electrodo modificado conduce a un límite de detección de 1.6×10^{-8} M mejorando en casi dos órdenes de magnitud el límite de detección conseguido con el electrodo de carbono vitrificado sin modificar (2.3×10^{-6} M).

Promediando las relaciones de intensidad de corriente para MIPE y NIPE en el intervalo de concentraciones estudiadas, se obtiene un valor del MIPE 18 veces superior al del NIPE, hecho que pone de manifiesto un claro efecto de impresión molecular.

Por analogía con el funcionamiento de los inmunoensayos, a la representación de la intensidad de corriente frente a la concentración de analito se podría denominar "curva de dosis-respuesta". En base a lo expuesto en el apartado anterior, la intensidad podría considerarse como una medida de la fracción de HVA enlazada al polímero. Si realizamos la representación de la intensidad de corriente frente al logaritmo de la concentración de HVA se obtiene la gráfica de la figura 7.26.

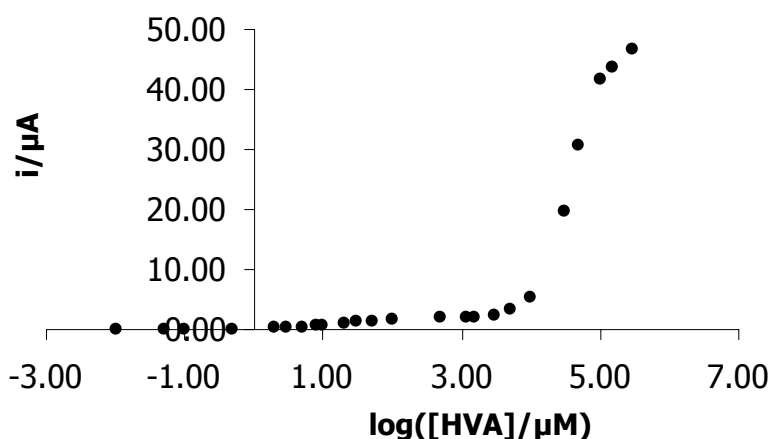


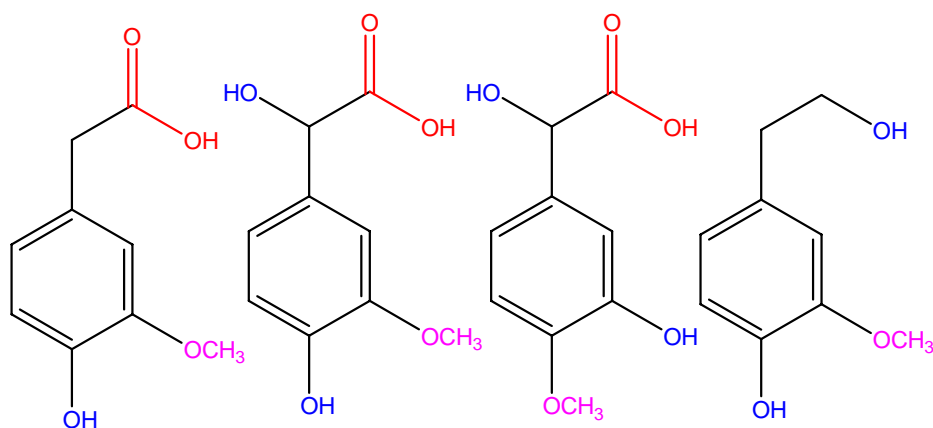
Figura 7.26. (Tablas, T-28).- Gráfica de calibración en formato semilogarítmico obtenida mediante voltametría diferencial de pulso para un MIPE sintetizado a un valor de t (UV) de un minuto. El registro voltamétrico se realizó en una reguladora de citrato/HCl 0.1 M y pH=1.10 exenta de HVA con un 40% de acetonitrilo, previa etapa de incubación en una disolución de HVA en tolueno.

Esta curva de forma sigmoide es la que cabría esperar en un inmunoensayo. En este caso, el reactivo limitante sería el MIP y el disolvente (agua, citrato) competiría con el HVA por los sitios de reconocimiento de la película polimérica. Por otro lado, las energías de estabilización calculadas para la asociación de TFMAA con agua o citrato (sección 4.2.9) son superiores o del orden a las obtenidas para HVA con este monómero funcional, por lo que estos compuestos competirían favorablemente con el HVA por los sitios de unión en dicha capa polimérica.

7.3.5.- Reactividad cruzada

La selección de moléculas de prueba para el estudio de la selectividad se realizó en base a la presencia de grupos funcionales similares a los de la molécula molde con el fin de obtener información de la naturaleza de los sitios de unión en el polímero.

La incubación del MIPE, NIPE, y electrodo de carbono vitrificado sin modificar (GCE), se llevó a cabo en una disolución de HVA o uno de sus tres análogos estructurales en tolueno para una concentración 5×10^{-6} M (figura 7.27).



	HVA	VMA	IVMA	MHPE
E/V	0.85	0.88	0.95	0.87
i(MIPE)/μA	0.45	2.94	2.37	0.11
i(NIPE)/μA	0.02	2.68	2.16	0.13
i(GCE)/μA	0.0	0.0	0.0	0.0
iMIPE/iNIPE	22	1	1	1

Figura 7.27.- Estructuras de las moléculas de prueba para la evaluación de la selectividad. Se detallan a su vez los potenciales de pico e intensidades de corriente para el electrodo de carbono vitrificado sin modificar (GCE), para MIPE y NIPE (sintetizados para un t (UV) de un minuto), y la relación de intensidades MIPE/NIPE.

A partir de los datos obtenidos puede deducirse que ninguno de los compuestos seleccionados se adsorbe sobre la superficie de carbono vitrificado, y consiguientemente la intensidad de la señal obtenida con los electrodos modificados se debe atribuir en su totalidad a la especificidad de fijación en la capa polimérica.

La molécula de VMA, que posee un grupo carboxilo terminal y los grupos metóxido e hidroxilo en las mismas posiciones que HVA, interfiere fuertemente. La mayor intensidad de corriente encontrada en relación al valor obtenido con HVA después de una incubación en las mismas condiciones puede ser debida a contribuciones no específicas (del grupo hidroxilo de la cadena lateral de dichos compuestos), puesto que también aumenta relativamente la señal obtenida con el electrodo modificado con el polímero no impreso.

La molécula de IVMA se diferencia estructuralmente de la del VMA en las posiciones de los grupos metóxido e hidroxilo, situados en las posiciones 4 y 3 respectivamente. Con este compuesto se observa una interferencia menor que en el caso anterior. Por lo tanto, el intercambio de estos dos grupos funcionales con respecto al HVA hace que se modifiquen ligeramente las propiedades de reconocimiento de los sitios de unión, contribuyendo aunque débilmente al reenlace del HVA. Este hecho confirmaría los resultados teóricos expuestos anteriormente (sección 4.3).

Por último, la molécula de MHPE se diferencia de los demás compuestos ensayados en que posee un grupo hidroxilo terminal en el lugar del grupo ácido del HVA, manteniendo las posiciones del grupo metóxido e hidroxilo en posición 3 y 4 respectivamente, como en la molécula molde. En este caso no se observa interferencia con el HVA, a pesar de la posibilidad de que puede formar un puente de hidrógeno a través de los grupos hidroxilo y metóxido del MHPE.

Por otro lado, las señales del electrodo modificado con polímero molecularmente impreso y no impreso son prácticamente iguales, y mucho menores que las obtenidas con HVA, lo que indica adsorción inespecífica del mismo.

Podemos concluir, por tanto, que la sustitución del grupo ácido del HVA por un grupo hidroxilo modifica drásticamente la afinidad por el sitio de reconocimiento. Dicho de otro modo, la formación del doble puente de hidrógeno entre los grupos ácidos de la molécula molde y el sitio de unión constituye la interacción determinante en la capacidad de reconocimiento del sensor (en mayor medida que la interacción con los grupos metóxido e hidroxilo en posiciones 3 y 4 respectivamente), confirmando los resultados obtenidos mediante cálculos DFT.

Si se realiza el mismo estudio de reactividad cruzada para una capa más gruesa (tres minutos de t (UV) en lugar de uno), se obtiene idéntico comportamiento, aunque las intensidades de corriente son inferiores, ya que como vimos con anterioridad, la capacidad de reconocimiento de la capa decae con el espesor de las mismas y con el aumento del t (UV). Los resultados se recogen en la figura 7.28.

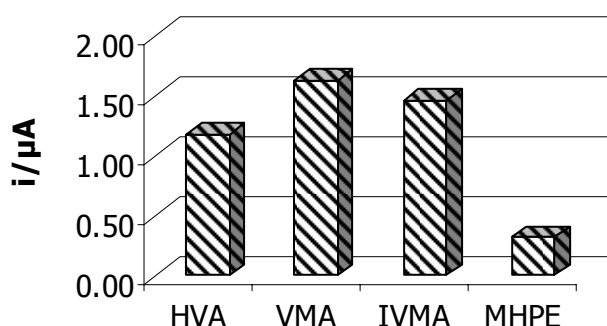


Figura 7.28. (Tablas, T-29).- Intensidades de corriente para un MIPE sintetizado tras 3 minutos de t (UV) e incubado en una concentración de 5×10^{-3} M en tolueno de las distintas especies interferentes estudiadas.

7.3.6.- Estabilidad operacional, conservación y vida útil del electrodo

Inicialmente los electrodos proporcionaban respuestas que correspondían a electrodos muy bloqueados (bajas corrientes de carga), y fue necesario un tiempo de equilibrio con un medio miscible en tolueno previo a la medida para observar una señal cuantificable. Esto podría indicar que quedaba tolueno residual del proceso de preparación dentro de los poros del polímero, impidiendo la entrada del electrolito, puesto que cuando se intentó establecer el equilibrado en disolución acuosa no se observó mejora en la respuesta. Con objeto de resolver el problema, los sensores fueron introducidos en una disolución de acetonitrilo durante cinco segundos antes de cada medida. De esta forma, se aseguró la eliminación de material débilmente adsorbido en el electrodo y la eliminación del tolueno empleado como disolvente porogénico y disolvente de incubación.

Los electrodos así preparados conservaron sus propiedades de reconocimiento durante al menos 25 ciclos de lavado e incubación, sin observar pérdida apreciable de la señal. En algunos casos fue posible realizar más de 80 ciclos de incubación y lavado con un mismo electrodo.

Es fundamental almacenar el electrodo sumergido en un disolvente orgánico (dioxano con un 20% v/v de metanol) que evite los cambios dimensionales del polímero en el ciclo de humectación y secado.

7.3.7.- Repetitividad y reproducibilidad

La reproducibilidad y reversibilidad del sensor se estudió repitiendo el ciclo de medida incubación-lavado con el mismo sensor y con distintos sensores sintetizados en idénticas condiciones. Para incubaciones sucesivas en una disolución de HVA de 5×10^{-5} M en tolueno, la desviación estándar relativa de las medidas para el mismo electrodo se situó en torno a un 3.2% (n=7), mientras que la desviación estándar para electrodos distintos sintetizados en idénticas condiciones fue de un 7.0% (n=16).

7.4.- Análisis de HVA en orina

7.4.1.- Introducción

Una vez estudiadas las características analíticas del sensor en patrones acuosos, el siguiente paso fue abordar el análisis de HVA en muestras biológicas, más concretamente en orina.

En dicho fluido biológico, la excreción de dos de los productos finales del metabolismo de catecolaminas, HVA y VMA, por encima de los valores de referencia es indicativo de la existencia de desórdenes esquizoafectivos y de la presencia de tumores de la cresta neural, como neuroblastoma (tumor pediátrico) y feocromocitoma (tumor en adultos). Por esa razón, la concentración de HVA se ha utilizado desde 1957 como diagnóstico de estas enfermedades, y los cambios en esa concentración indican la evolución de la enfermedad con el tratamiento³²⁴.

El análisis de una muestra biológica supone de por sí un importante reto, ya que la matriz de la muestra puede resultar extremadamente compleja, máxime cuando se trabaja, como es nuestro caso, sobre orina de pacientes, que, en muchos casos, estaban siendo medicados con distintos fármacos. Además, como se ha comentado en la sección 7.1.4.D, apenas existen trabajos en la bibliografía en los que se haya utilizado un sensor electroquímico basado en MIPs para análisis de muestras reales. Intentando superar estas limitaciones, se plantea como objetivo en este apartado investigar el grado de exactitud de la respuesta del sensor, contrastando nuestros resultados con los obtenidos a partir del análisis de las muestras mediante HPLC.

Las muestras de orina manejadas en este estudio fueron suministradas por el Hospital Central de Asturias de manera anónima y fueron previamente analizadas por el laboratorio del Hospital mediante

HPLC en fase reversa, modo isocrático, con detección electroquímica y purificación previa en columnas desechables de intercambio iónico.

7.4.2.- Análisis directo de orina con un electrodo de carbono vitrificado sin modificar (GCE) por voltametría diferencial de pulso (DPV)

Inicialmente, con objeto de determinar los procesos electroquímicos presentes en la orina, se realizó un voltamperograma diferencial de pulso con un electrodo de carbono vitrificado sin modificar en una mezcla de orinas de pacientes diluida 1:10 en citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10, adicionando a continuación concentraciones crecientes de HVA. Los voltamperogramas obtenidos se representan en la figura 7.29.

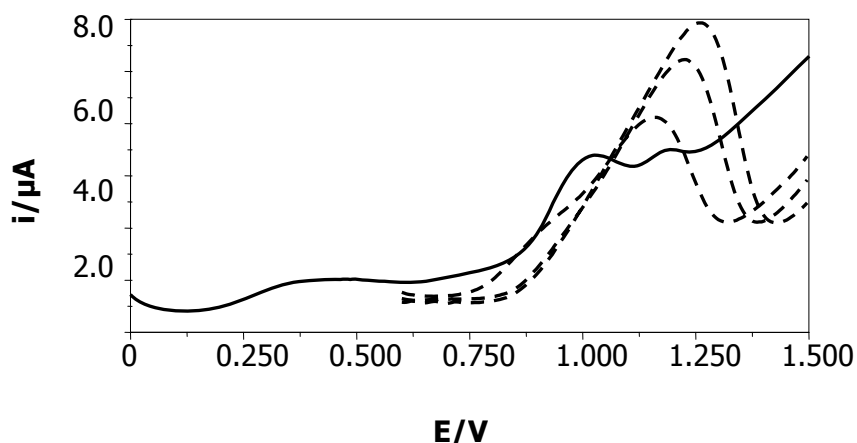


Figura 7.29.- Voltamperograma diferencial de pulso obtenido con un electrodo de carbono vitrificado sin modificar en un medio de orina diluida 1:10 con citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10 (trazo continuo). Las líneas de trazo discontinuo se corresponden con adiciones sucesivas de HVA para una concentración en celda de 2×10^{-4} M, 4×10^{-4} M y 6×10^{-4} M, respectivamente.

Como se puede apreciar, la orina presenta al menos tres procesos. El pico a un potencial aproximado de 0.3 V es una interferencia que se observa en todas las muestras procesadas, y que crece a lo largo de barridos sucesivos, por lo que puede atribuirse a una especie que se adhiere fuertemente sobre la superficie electródica. Los dos picos observados a 0.95 V y 1.10 V podrían corresponderse con los procesos del HVA y VMA, que se encuentran en elevadas concentraciones en orina, aunque sus potenciales están excesivamente desplazados respecto de los originales (recordemos que el potencial del HVA para un MIPE en citrato/HCl 0.1M y pH 1.10 es de 0.85 V). En efecto, si la superficie electródica está parcialmente bloqueada por componentes de la propia matriz de la muestra, al añadir cantidades crecientes de HVA cabría esperar un desplazamiento del potencial de oxidación hacia valores mayores.

La figura 7.30 muestra el comportamiento observado para la intensidad de corriente cuando se realizan adiciones sucesivas de HVA sobre una muestra de orina diluida 1:10 con citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10.

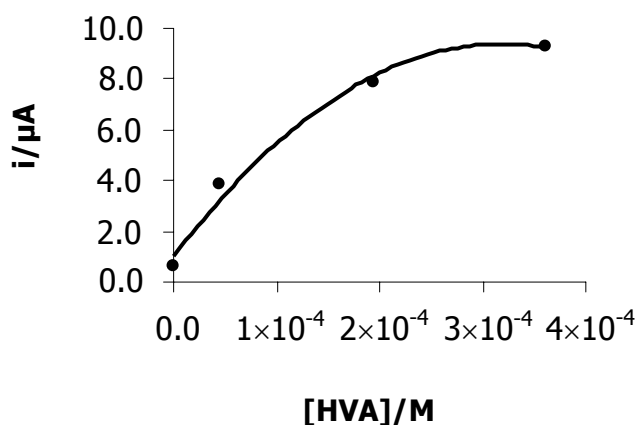


Figura 7.30. (Tablas, T-30).- Curva de adiciones estándar para un GCE en orina diluida 1:10 con citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10.

Como se puede observar, esta tendencia no es lineal y para poder realizar la determinación de HVA voltaméricamente se hace preciso eliminar dichas interferencias de la matriz.

7.4.3.- Análisis directo de orina con un electrodo modificado con polímero molecularmente impreso (MIPE) por DPV

Al igual que para el GCE, se investigaron los procesos en disolución para un MIPE sintetizado con un t (UV) de un minuto cuando se realiza una incubación directa y sucesivas adiciones estándar de HVA para una mezcla de orinas de pacientes diluida 1:10 en citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10. Los voltamperogramas obtenidos se muestran en la figura 7.31.

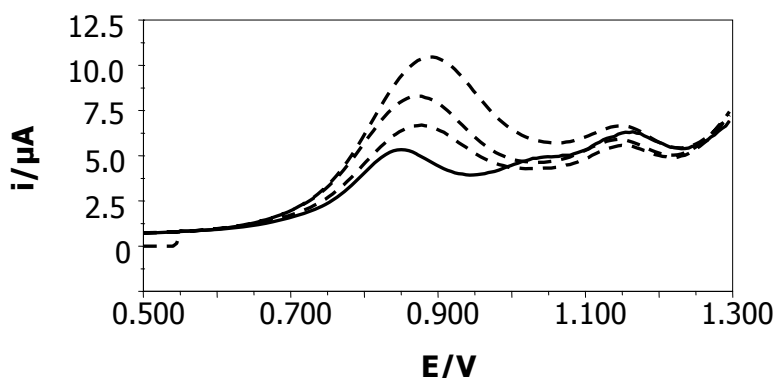


Figura 7.31.- Voltamperograma diferencial de pulso para un electrodo de carbono vitrificado modificado con polímero molecularmente impreso (MIPE) sintetizado a un t (UV) de un minuto tras una etapa de incubación en un medio de orina diluida 1:10 con citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10 con un 40% de acetonitrilo (trazo continuo). Las líneas de trazo discontinuo se corresponden con adiciones sucesivas de HVA para una concentración en celda de 2.0×10^{-4} M, 1.4×10^{-3} M y 2.2×10^{-3} M, respectivamente.

Al igual que sucedía para el GCE, se observan tres procesos, sin embargo, en este caso el potencial estándar del HVA no se encuentra tan desplazado, lo que indica una menor adherencia de posibles interferentes sobre la superficie electródica, en definitiva, un menor envenenamiento del electrodo. Aunque ésta es una característica favorable para el sensor, cuando se realiza la cuantificación a partir de adiciones estándar, la extrapolación de la recta obtenida arroja una concentración de HVA en la muestra 42 veces superior a la concentración obtenida por HPLC. Las razones de esta sobreestimación pueden ser diversas.

Una de las hipótesis que se puede plantear es que en medio acuoso moléculas potencialmente interferentes interaccionen con el sitio de unión, obteniéndose una señal conjunta al mismo potencial de oxidación que el HVA. Recordemos que en el apartado 4.3 se realizó un estudio teórico de reactividad cruzada. Los resultados obtenidos (basados en el cálculo de la energía de interacción entre el monómero funcional y análogos estructurales del HVA) apuntaban a que moléculas tales como VMA, IHVA, IAA, dopamina, epinefrina, norepinefrina, metanefrina y normetanefrina, que también están presentes en orina, podrían interferir fuertemente en la determinación de HVA. Además, como hemos visto, el agua compite por los sitios de unión del sensor, es más, favorece el desalojo de la molécula molde de los sitios de unión y es posible que pueda favorecer la interacción de otras moléculas interferentes. En consecuencia, habrá que diseñar una estrategia que elimine potenciales interferentes, y además permita realizar la incubación en un medio orgánico, preferentemente tolueno, como indican las predicciones teóricas.

7.4.4.- Extracción líquido-líquido de catecolaminas y eliminación de interferentes

Vistas las limitaciones del análisis directo en orina, se ensayó un procedimiento de extracción en cloroformo citado en la bibliografía¹²⁷ y que se describió en detalle en la sección 5.3.5 de este trabajo.

La hipótesis de partida es que mediante la extracción se pueda obtener de forma selectiva los metabolitos de las catecolaminas de interés, fundamentalmente HVA, y eliminar otros posibles interferentes. Las curvas DPV obtenidas después de la extracción para un MIPE sintetizado con un $t(UV)$ de un minuto se presentan en la figura 7.32.

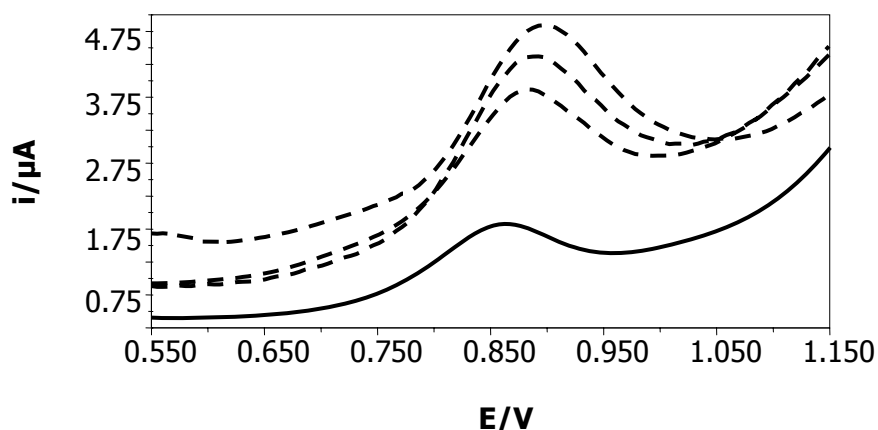


Figura 7.32.- Voltamperograma diferencial de pulso obtenido en un medio de citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10 con un 40% de acetonitrilo para un MIPE después de una etapa de incubación en un extracto reconstituido en tolueno (trazo continuo). Las líneas de trazo discontinuo se corresponden con adiciones sucesivas de HVA para una concentración en celda de 4.8×10^{-5} M, 9.48×10^{-5} M y 1.42×10^{-4} M, respectivamente.

Se puede apreciar que el voltamperograma es mucho más limpio, se observa un único proceso, y ya no existen grandes desplazamientos de

potencial del HVA, por lo que, aparentemente el procedimiento de extracción es capaz de eliminar gran número de interferentes.

A. Recuperación

Este estudio se realizó adicionando concentraciones conocidas de HVA sobre una mezcla de orinas de voluntarios sanos y cuantificando con el sensor mediante adiciones estándar. La tabla 7.7 recoge los resultados obtenidos para tres extracciones.

Tabla 7.7.- Recuperaciones obtenidas con un sensor sintetizado a un $t(UV)$ de un minuto para el procedimiento de extracción en cloroformo.

[HVA]/M adicionado	[HVA]/M recuperado*	% recupe.	Recta de adiciones	n	r
5.21×10^{-5}	3.12×10^{-5}	59.9	$y = 4.86 \times 10^{-3} x + 1.73 \times 10^{-6}$	5	0.951
8.05×10^{-5}	4.69×10^{-5}	58.2	$y = 3.90 \times 10^{-4} x + 2.09 \times 10^{-7}$	5	0.995
2.77×10^{-5}	1.64×10^{-5}	59.2	$y = 2.26 \times 10^{-2} x + 4.22 \times 10^{-6}$	6	0.967

*Descontada la concentración basal de HVA en la muestra.

Como se puede observar, las recuperaciones obtenidas con este procedimiento son cercanas al 60%.

B. Análisis de HVA en orina de voluntarios sanos

La orina de voluntarios sanos contiene niveles basales de catecolaminas: HVA, VMA, IAA, dopamina, epinefrina, norepinefrina, normetanefrina, metanefrina, etc. Por esa razón, antes de estudiar la concentración de HVA en orinas de pacientes con esta metodología, se analizó una mezcla de orinas de voluntarios sanos con el sensor para

determinar el nivel basal de HVA (en la bibliografía³²⁵ se describen niveles normales de HVA para adultos entre 0.7 y 6.9 mg/24h (1.92×10^{-6} - 7.08×10^{-5} M)).

El valor promedio de HVA obtenido con el sensor para una mezcla de orinas de voluntarios adultos sanos fue de $(9.15 \pm 0.56) \times 10^{-6}$ M, que se encuentra dentro del rango de normalidad.

C. Análisis de HVA en orina de pacientes

En la tabla 7.8 se muestran las referencias de las muestras analizadas, las concentraciones de HVA obtenidas por HPLC (suministradas por el Hospital Central de Asturias) y la obtenida con el sensor, y por último la relación de concentraciones que nos indica el número de veces que se sobreestima la concentración.

Tabla 7.8.- Resumen comparativo de las concentraciones de HVA obtenidas mediante HPLC y con el sensor basado en polímeros molecularmente impresos.

Referencia muestra	[HVA] _{HPLC} /M	[HVA] _{sensor} /M	Sobreest.
1	1.21×10^{-5}	$(1.77 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	15
2	2.14×10^{-5}	$(4.02 \pm 0.05) \times 10^{-4}$	19
3	7.65×10^{-5}	$(1.37 \pm 0.06) \times 10^{-3}$	18
4	2.41×10^{-5}	$(3.94 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	16
5	2.69×10^{-5}	$(4.36 \pm 0.06) \times 10^{-4}$	16
6	3.18×10^{-5}	$(5.10 \pm 0.05) \times 10^{-4}$	16
7	1.65×10^{-5}	$(2.86 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	17
8	5.64×10^{-5}	$(9.71 \pm 0.07) \times 10^{-4}$	17
9	6.20×10^{-5}	$(9.95 \pm 0.08) \times 10^{-4}$	16
10	7.24×10^{-5}	$(1.26 \pm 0.12) \times 10^{-3}$	17

A la luz de estos resultados, podemos concluir que el procedimiento de extracción en cloroformo no elimina eficazmente los interferentes de la muestra, ya que, en todos los casos, al realizar el análisis con el sensor construido se sobreestima la concentración de HVA casi 20 veces. Con objeto de superar esta limitación, se ensayaron otros métodos basados en extracción en fase sólida con objeto de eliminar del medio potenciales interferentes, y a la vez, realizar el análisis de la catecolamina de interés.

7.4.5.- Eliminación de interferentes mediante cartuchos de extracción en fase sólida de intercambio aniónico fuerte (SAX)

A. Recuperación

Para la eliminación de potenciales interferentes de la muestra se empleó un cartucho de extracción en fase sólida de intercambio aniónico fuerte (SAX) siguiendo un procedimiento comercial que se describió en el apartado experimental 5.3.5 de este trabajo. Los datos correspondientes a las recuperaciones obtenidas para este procedimiento de extracción en orina de voluntarios sanos se detallan en la tabla 7.9.

Tabla 7.9.- Recuperaciones obtenidas con un sensor sintetizado a un t (UV) de un minuto para el procedimiento de extracción en cartucho de extracción en fase sólida SAX.

[HVA]/M adicionado	[HVA]/M recuperado*	% recupe.	Recta de adiciones	n	r
1.29×10^{-4}	5.67×10^{-5}	44.0	$y = 7.12 \times 10^{-3}x + 4.04 \times 10^{-7}$	4	0.996
1.75×10^{-4}	7.95×10^{-5}	45.4	$y = 3.12 \times 10^{-3}x + 2.48 \times 10^{-7}$	5	0.997
2.81×10^{-4}	1.26×10^{-4}	44.8	$y = 3.75 \times 10^{-3}x + 4.74 \times 10^{-7}$	5	0.995

*Descontada la concentración basal de HVA en la muestra.

En este caso, las recuperaciones son inferiores al 50%.

B. Análisis de HVA en orina de voluntarios sanos

El valor promedio de HVA obtenido con el sensor para la mezcla de orinas de voluntarios adultos sanos fue de $(8.93 \pm 0.41) \times 10^{-6}$ M, que se encuentra nuevamente dentro del rango de normalidad³²⁵.

C. Análisis de HVA en orina de pacientes

En la tabla 7.10 se resumen las referencias de las muestras analizadas, la concentración de HVA obtenida mediante HPLC (suministradas por el Hospital Central de Asturias) y la obtenida mediante el sensor, así como el número de veces que se sobreestima la concentración de HVA en la muestra.

Tabla 7.10.- Resumen comparativo de las concentraciones de HVA obtenidas mediante HPLC y con el sensor basado en polímeros molecularmente impresos.

Referencia muestra	[HVA] _{HPLC} /M	[HVA] _{sensor} /M	Sobreest.
1	1.21×10^{-5}	$(1.28 \pm 0.12) \times 10^{-4}$	11
2	2.14×10^{-5}	$(2.11 \pm 0.09) \times 10^{-4}$	10
3	7.65×10^{-5}	$(9.28 \pm 0.14) \times 10^{-4}$	12
4	2.41×10^{-5}	$(2.50 \pm 0.13) \times 10^{-4}$	10
5	2.69×10^{-5}	$(3.08 \pm 0.07) \times 10^{-4}$	11

Como se puede observar, la sobreestimación de la concentración de HVA en la muestra se reduce significativamente, lo que indica que este procedimiento de limpieza es más eficaz en la eliminación de interferentes que la extracción líquido-líquido.

Aunque se ha conseguido reducir la sobreestimación en la concentración de HVA, se ensayó otro procedimiento de limpieza basado esta vez en cartuchos de extracción en fase sólida C18, con objeto de reducir la sobrevaloración en la concentración de HVA. Los resultados obtenidos se exponen en el siguiente apartado.

7.4.6.- Eliminación de interferentes mediante cartuchos de extracción en fase sólida C18

A. Recuperación

Para eliminar un posible efecto de matriz en la muestra, se empleó un cartucho de extracción en fase sólida C18 siguiendo un procedimiento comercial para el análisis de catecolaminas en orina que se describió con detalle en el apartado experimental 5.3.5 de este trabajo. Los datos correspondientes a las recuperaciones obtenidas para este procedimiento de extracción en orina de voluntarios sanos se recogen en la tabla 7.11.

Tabla 7.11.- Recuperaciones obtenidas con un sensor sintetizado a un t (UV) de un minuto para el procedimiento de extracción en cartucho de extracción en fase sólida C18.

[HVA]/M adicionado	[HVA]/M recuperado*	% recupe.	Recta de adiciones	n	r
2.80×10^{-4}	2.30×10^{-4}	82	$y = 4.34 \times 10^{-3}x + 9.98 \times 10^{-7}$	5	0.994
4.14×10^{-3}	3.31×10^{-3}	80	$y = 1.73 \times 10^{-3}x + 5.73 \times 10^{-6}$	5	0.997
1.71×10^{-5}	1.40×10^{-5}	82	$y = 8.41 \times 10^{-3}x + 1.18 \times 10^{-7}$	4	0.998

*Descontada la concentración basal de HVA en la muestra.

Las recuperaciones en este caso están en el rango del 80-82%.

B. Análisis de HVA en orina de voluntarios sanos

Los niveles basales de HVA obtenidos con el sensor para la mezcla de orinas de voluntarios adultos sanos fue de $(1.24 \pm 0.36) \times 10^{-5}$ M, que se encuentra nuevamente dentro del rango de normalidad³²⁵.

C. Análisis de HVA en orina de pacientes

En la tabla 7.12 se muestran las referencias de las muestras analizadas, las concentraciones de HVA obtenidas mediante HPLC y el sensor, y por último la relación de concentraciones que indica el número de veces que se sobrevalora la concentración.

Tabla 7.12.- Resumen comparativo de las concentraciones de HVA obtenidas mediante HPLC y con el sensor basado en polímeros molecularmente impresos.

Referencia muestra	[HVA] _{HPLC} /M	[HVA] _{sensor} /M	Sobreest.
1	1.21×10^{-5}	$(7.77 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	6
2	2.14×10^{-5}	$(15.12 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	7
3	7.65×10^{-5}	$(54.39 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	7
4	2.41×10^{-5}	$(19.96 \pm 0.03) \times 10^{-5}$	8
5	2.69×10^{-5}	$(18.36 \pm 0.07) \times 10^{-5}$	7
6	3.18×10^{-5}	$(19.89 \pm 0.09) \times 10^{-5}$	6
7	1.65×10^{-5}	$(13.93 \pm 0.04) \times 10^{-5}$	8
8	5.64×10^{-5}	$(40.06 \pm 0.08) \times 10^{-5}$	7
9	6.20×10^{-5}	$(38.62 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	6
10	7.24×10^{-5}	$(64.26 \pm 0.09) \times 10^{-5}$	9

Nuevamente, y al igual que ocurría en ensayos precedentes, todos los análisis sobrevaloran la concentración de HVA presente en las muestras. Como se adelantaba en un apartado anterior, este hecho se puede correlacionar con el estudio teórico de selectividad (apartado 4.3). Si recordamos, en ese estudio se analizó la interacción del TFMAA (sitio de unión del sensor) con varias catecolaminas estructuralmente similares a la molécula molde, así como potenciales interferentes de la misma. El resultado fue que varios compuestos como VMA, IHVA, IAA, dopamina, epinefrina, norepinefrina, metanefrina y normetanefrina podían competir con el HVA por los sitios de unión del sensor.

En orina, están presentes muchas de estas catecolaminas o sus metabolitos, además de otras especies, y ni el procedimiento de extracción con cloroformo ni el empleo de cartuchos de extracción en fase sólida fueron lo suficientemente efectivos como para aislar al HVA y dejar el resto de catecolaminas en fase acuosa. Por esa razón, es posible que la sobreestimación del HVA sea consecuencia de que no solamente se está cuantificando este metabolito, sino una mezcla de compuestos, cada uno de ellos con distinta afinidad por el sitio de unión. Además, debido a que son estructuralmente muy similares al HVA no se pueden distinguir sus señales en función del potencial redox, obteniéndose un pico ancho al mismo potencial que el HVA y que es probablemente suma de las respuestas de varios metabolitos presentes en la orina.

Puesto que el ácido homovanílico y el ácido vanililmandélico son los metabolitos de catecolaminas mayoritarios en orina y además alcanzan valores muy elevados en caso de neuroblastoma o feocromocitoma⁵⁹, la utilidad analítica del sensor podría dirigirse a una estimación conjunta de ambas especies. Esta aplicación sería útil en clínica para realizar un *screening* o cribado inicial y diferenciar muestras patológicas de normales.

7.4.7.- Conclusión

Los resultados obtenidos con muestras de orina indican que con el sensor y los protocolos de análisis desarrollados en este trabajo se sobreestima la concentración de HVA. Como hemos visto en la sección 7.3.3.E, la respuesta del sensor se basa en la preconcentración de HVA en la capa polimérica y su posterior difusión hacia la superficie del electrodo.

Los datos experimentales muestran que cuando se utiliza el sensor en muestras de orina se preconcentran también otros compuestos que interfieren en la respuesta, y esta contribución no se elimina introduciendo una etapa de limpieza de muestra. Esta interferencia puede ser debida al hecho de que la energía de estabilización de los aductos formados por el monómero funcional seleccionado (TFMAA) y varios análogos estructurales del HVA presentes en la orina es equivalente o superior a la energía de estabilización del aducto formado por TFMAA y HVA en el disolvente seleccionado. Por tanto, el método computacional desarrollado en este trabajo es capaz de predecir la respuesta del sensor en uso real en muestras de orina.

Estos resultados aconsejan examinar una estrategia de aplicación analítica de este MIP radicalmente distinta: su uso como fase estacionaria para cromatografía líquida. Con esta técnica, se podrían aprovechar las distintas afinidades de estos compuestos por la fase estacionaria, que se derivarían de los distintos valores de las energías de estabilización teóricas de los aductos calculados. Estas diferencias se podrían explotar para separar los compuestos por sus distintos tiempos de retención en la fase estacionaria polimérica, preparada con la composición óptima estudiada en este trabajo.

Capítulo 8

Conclusiones

1. Se ha desarrollado un método para el diseño racional de polímeros molecularmente impresos basado en cálculos DFT de la energía de estabilización del aducto de prepolimerización formado por la molécula molde y los monómeros funcionales, en el disolvente seleccionado. El modelo parte de la hipótesis de que la combinación de monómero funcional y disolvente que lleve a la menor energía de estabilización del aducto conducirá al mejor receptor polimérico. El efecto del disolvente se incluye utilizando el modelo del Continuo Polarizado.
2. Los resultados de los cálculos DFT indican que en fase gas el ácido homovanílico (HVA) forma el complejo más estable con el monómero funcional ácido 2-trifluorometacrílico (TFMAA), en el que los grupos ácido de las dos moléculas establecen un doble puente de hidrógeno. Análogamente, el ácido metacrílico (MAA) y la 2-metacrilamida (MA) también forman un doble puente de hidrógeno entre el grupo ácido del HVA y el grupo ácido y amida, respectivamente de los dos

monómeros. Por último, el monómero funcional 4-vinilpiridina (VPY) forma un puente de hidrógeno entre el grupo ácido del ácido homovanílico y el nitrógeno piridínico, sin producirse transferencia protónica del ácido homovanílico a la 4-vinilpiridina. La comparación de las energías de Gibbs de los complejos HVA-monómero funcional indica que el TFMAA presenta mayor interacción con el HVA (-8.4 kcal/mol) que MAA (-3.8 kcal/mol), MA (-2.7 kcal/mol) y VPY (+0,2 kcal/mol).

3. Los disolventes tolueno, cloroformo, acetonitrilo y diclorometano favorecen la formación de varios complejos HVA-monómero funcional que no son estables en fase gas, siendo mayor el número de complejos HVA-TFMAA. Para el ácido 2-trifluorometacrílico, los complejos más estables con el ácido homovanílico se forman en tolueno, al igual que para el resto de monómeros. El agua, es el disolvente más desfavorable tanto para el ácido 2-trifluorometacrílico como para el resto de monómeros funcionales debido a que interacciona con las moléculas de molde y monómero dificultando su interacción a través de puentes de hidrógeno.
4. De cara a la síntesis del polímero molecularmente impreso óptimo para la detección del ácido homovanílico, el método computacional desarrollado en este trabajo indica que el monómero TFMAA y el disolvente tolueno son los más adecuados. El entrecruzador etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) no compite con los monómeros estudiados por los sitios de unión del ácido homovanílico.
5. La selección del monómero funcional y el disolvente óptimo predicho por los cálculos DFT se confirma experimentalmente mediante ensayos de unión.

6. Para un polímero sintetizado en las condiciones óptimas, el análisis de los resultados de los ensayos de unión empleando como modelos las isothermas de Langmuir, Freundlich y Langmuir-Freundlich muestra que el modelo de Freundlich es el que mejor se ajusta a los resultados experimentales. Utilizando este modelo, se obtienen para el MIP una constante de afinidad promedio de $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y un número de sitios de unión promedio de $13 \text{ } \mu\text{mol/g}$, de las más altas descritas hasta el momento en la bibliografía¹⁷⁸⁻¹⁸⁴.
7. Se ha conseguido desarrollar un sensor para la determinación de HVA empleando electrodos de carbono vitrificado modificados con una fina película de polímero impreso preparado mediante recubrimiento bajo rotación y polimerización fotoquímica. Cuando en la síntesis del polímero se emplean el monómero funcional y el disolvente óptimo de acuerdo al método computacional DFT, los sensores presentan buenas propiedades de reconocimiento de la molécula molde (HVA). Cuando se modifican los electrodos con polímeros impresos preparados con otros monómeros funcionales y disolventes, la señal de reconocimiento molecular es de menor magnitud. Se ha comprobado por tanto la validez de las predicciones teóricas mediante el uso del sensor voltamétrico construido para la determinación de HVA.
8. El ácido homovanílico no se adsorbe sobre electrodos de carbono vitrificado sin modificar, mientras que con los electrodos modificados con polímeros impresos es posible realizar una preconcentración y su posterior cuantificación, tras la transferencia a un medio exento de analito, utilizando voltametría diferencial de pulso. Se comprobó que el mejor medio para llevar a cabo esta preconcentración es tolueno, hecho que está de acuerdo con las predicciones teóricas realizadas.

Conclusiones

Con más de 15 minutos de incubación en tolueno no se observa un aumento significativo de la intensidad del pico de oxidación de HVA. Con los electrodos así modificados se obtiene un límite de detección del HVA de 1.6×10^{-8} M y un intervalo dinámico lineal de tres órdenes de magnitud (10^{-8} - 10^{-5} M). Electrodo modificado con polímeros preparados con el mismo procedimiento pero en ausencia de ácido homovanílico no dan respuesta a concentraciones inferiores a 10^{-6} M.

9. Los electrodos modificados con los polímeros impresos diseñados en este trabajo deben someterse primeramente a un lavado en acetonitrilo para eliminar el disolvente porogénico (tolueno) residual y acondicionar la membrana para operar en medio acuoso. Se pueden usar al menos en 25 ciclos de lavado e incubación. Como disolvente de lavado se utilizó dioxano con un 20% v/v de metanol, ya que se comprobó que eliminaba también los productos de oxidación electroquímica. Para el almacenamiento de los sensores se empleó el mismo disolvente. En estas condiciones la desviación estándar relativa para un mismo electrodo fue del 3.2% (n=7) y con electrodos distintos del 7.0% (n=16).
10. Los estudios realizados con electrodo de disco rotatorio para las capas poliméricas arrojan, como cabría esperar, valores de permeabilidad superiores para el electrodo modificado con el polímero impreso que para el modificado con el no impreso. Estos valores son del orden de 10^{-5} cm²/s y ligeramente distintos si se obtienen aplicando el modelo de Koutecky-Levich o un método iterativo, hecho que se ha observado también en otras publicaciones³²².

11. El mecanismo de respuesta del sensor se basa en la preconcentración del HVA en la capa polimérica en el disolvente óptimo (tolueno), transferencia a otro disolvente que favorezca su liberación de los sitios de unión y, por último, la difusión desde los sitios de unión a la superficie del electrodo. La sensibilidad del método desarrollado depende de la capacidad de preconcentración de la capa polimérica. El uso de agentes retardantes de la polimerización (isooctano y PVAC) o grandes cantidades de disolvente conducen a una estructura polimérica más abierta y se observa una disminución de la señal, que se ha atribuido a una pérdida de la capacidad de preconcentración.

12. El estudio realizado mediante cálculos DFT con análogos estructurales del ácido homovanílico: ácido vanillilmandélico (VMA), ácido isovanillilmandélico (IVMA), ácido isohomovanílico (IHVA), alcohol homovanílico (MHPE) y ácido indolacético (IAA) indica que la formación de un doble puente de hidrógeno entre el grupo carboxilo de la molécula de prueba y el grupo carboxilo del sitio de unión es la interacción que determina el proceso de reconocimiento molecular. Los experimentos de reactividad cruzada realizados tanto con material particulado como con el sensor corroboran la validez las predicciones teóricas, siendo el doble puente de hidrógeno la interacción que domina el enlace del analito al sitio de unión. El estudio teórico con moléculas potencialmente interferentes al HVA en muestras de orina, entre las que se encuentran análogos estructurales de carácter básico: dopamina, epinefrina, norepinefrina, metanefrina y normetanefrina y análogos de carácter ácido: VMA, IHVA, MHPE e IAA, muestra que, exceptuando MHPE, todos los metabolitos estudiados podrían competir con el HVA por los sitios de unión al sensor.

13. El método de análisis empleado en este trabajo sobreestima la concentración de HVA en muestras de orina. Esta falta de exactitud se puede justificar teniendo en cuenta que el método computacional desarrollado para estudiar la afinidad del polímero también permite predecir la interferencia de varios compuestos endógenos de la matriz de la orina. Se cree en consecuencia, que ésta es la razón de que la determinación de HVA en este tipo de muestras no sea especialmente selectiva, ya que la respuesta que se obtiene del sensor sería la suma de las correspondientes a todas las especies interferentes presentes en el medio.

14. El método computacional basado en cálculos DFT desarrollado en este trabajo puede emplearse para resolver problemas cruciales en el campo de la impresión molecular, como son la selección del mejor monómero funcional, el mejor disolvente, el mejor medio de incubación, incluso predecir la selectividad del polímero sintetizado, reduciéndose de esta manera gran número de etapas de experimentación que la mayoría de los investigadores condenan a la práctica empírica.

Sugerencias para trabajos futuros

Como resultado de la experiencia alcanzada durante la realización de la presente Tesis doctoral y en vista de los resultados obtenidos, se pueden sugerir las siguientes vías para continuar la investigación en el campo de las aplicaciones analíticas de los polímeros impresos.

1. La línea de trabajo más inmediata sería mejorar la aplicación analítica del sensor para la determinación de HVA en muestras de orina, ya que no se consiguieron correlacionar los resultados del sensor con los obtenidos mediante HPLC. Esto es debido a que el electrodo modificado con polímero molecularmente impreso no es capaz de discriminar de forma selectiva al HVA del resto de metabolitos presentes en la orina. Si recordamos el apartado 4.3, la mayor parte de las especies potencialmente interferentes tienen estructuras muy similares al HVA, y tienen en común un grupo ácido carboxílico, que como apuntan los cálculos teóricos, es el que más contribuye al enlace en el sitio de unión. Por esa razón, todas ellas poseen afinidades similares al HVA en el sitio de enlace. La única vía factible para solventar este problema sería pasar de la operación de separación/preconcentración del analito tras una sola etapa de contacto (ensayo de unión con el sensor en la capa delgada de MIP) a una operación de contacto multietapa, es decir, a una separación cromatográfica, en la que se utilizaría el MIP en forma de material particulado como fase estacionaria de una columna de cromatografía líquida.

De esta forma se emplearía una estrategia similar a la existente actualmente en los Hospitales para el análisis de catecolaminas en orina, con la diferencia de que, en lugar de utilizar una columna con un relleno C18, se emplearía un relleno de afinidad específico para el metabolito en cuestión, con la esperable mejora en selectividad.

2. Una línea prometedora y actualmente en desarrollo por nuestro grupo de investigación es la extensión de la metodología DFT al diseño de fases sensoras de otros sustratos de interés farmacológico o ambiental.

Dentro de esta línea de trabajo se considera la posibilidad de abordar con esta metodología el diseño de fases sensoras con capacidad de conversión catalítica de la molécula molde seleccionada. De esta forma, se orientaría el trabajo hacia un objetivo de mayor complejidad, como es la construcción de una fase sensora capaz de mimetizar la capacidad catalítica de determinadas proteínas enzimáticas, como por ejemplo la enzima Cloroperoxidasa (CCPO). Esta enzima cataliza, entre otras, la reacción de deshalogenación del 2, 4, 6-triclorofenol (TCP) y se caracteriza porque su centro activo posee la misma estructura (salvo por un ligando cisteína unido al hierro) que la cloroprotoporfirina IX de hierro (III) (clorohemin), disponible de forma comercial. El diseño del polímero sería el de un MIP catalítico: el clorohemin se comportaría como un monómero más, ya que posee grupos vinilo polimerizables, el entrecruzador y el resto de monómeros generarían una carcasa rígida alrededor de la molécula molde, TCP. Tras la extracción del TCP del polímero mediante lavados, la incubación del TCP en presencia del polímero y peróxido de hidrógeno generaría el producto de oxidación correspondiente, 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona, que podría medirse electroquímicamente. La idea sería modelizar un enzima sintético que fuera capaz de catalizar la reacción de deshalogenación del TCP específicamente, ya que el polímero acrílico sintetizado tendría un efecto de memoria molecular.

Las predicciones teóricas jugarían aquí un papel crucial ya que orientarían el diseño experimental del MIP catalítico mediante la selección del mejor monómero funcional y disolvente para el aducto TCP-centro activo de la enzima. A pesar de que aún nos encontramos en una etapa incipiente, los resultados experimentales obtenidos en el grupo de investigación son muy alentadores, por lo que se continúa explorando esta vía a día de hoy.

Bibliografía

1. Breslow. R., *Acc. Chem. Res.*, **28** (1994) 146
2. Breslow. R., *Chemistry & Biology*, **5** (1998) R27
3. Shea. K.J., *Trends Polym. Sci.*, **2** (1994) 166.
4. Mosbach. K., *Trens Biochem. Sci.*, **19** (1994) 9.
5. Flam. F., *Science*, **263** (1994) 1221.
6. Wulff. G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34** (1995) 1812.
7. Haupt. K, Mosbach. K., *Chem. Rev.*, **100** (2000) 2495.
8. Andersson. L.I., *J. Chromatogr. B*, **745** (2000) 3.
9. Takeuchi. T, Matsui. J., *Acta Polym.*, **47** (1996) 471.
10. Takeuchi. T, Haginaka.J., *J. Chromatogr. B*, **728** (1999) 1.
11. Tanabe. K, Takeuchi. T. Matsui. J, Ikebukuro. K, Karube. Y., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1995) 2303.
12. Wulff. G, Sarhan. A, Zabrocki. K., *Tetrahedron Lett.*, (1973) 4329.
13. Wulff. G, Sarhan. A., *Angew. Chem.*, **84** (1972) 364.
14. Wulff. G, Sarhan. A., DOS 2242796, 1974 [Chem. Abstr. 83 (1975) P60300w]; Wulff.G, Sarhan. A., US-A 4127730, 1978 (versión extendida de la patente anterior).
15. Haupt. K., *Analyst*, **126** (2001) 747.
16. Mayes. A, Mosbach. K., *Trends. Anal. Chem.*, **16** (1997) 321.
17. Mosbach. K, Ramstrom. O., *Bio/Technology*, **14** (1996) 163.
18. Andersson. L.I, Nicholls. I.A, Mosbach. K, Nelson. J.O, Karu. A.E, Wong. R.B., *Immunoanalysis of Agrochemicals* (ACS Symposium Series, N° 586), American Chemical Society, Washington D.C, 1995.
19. Cram. D.J., *Angew. Chem.*, **100** (1988) 1041; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **27** (1988) 1009.
20. Lehn. J.M., *Angew. Chem.*, **100** (1988) 91; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **27** (1988) 89.
21. Wenz. G., *Angew. Chem.*, **106** (1994) 851; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **33** (1994) 803.

Bibliografía

22. Kirby. A. J., *Angew. Chem.*, **108** (1996) 770; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35** (1996) 707.
23. Wulff. G., *Chem. Rev.*, **102** (2002) 1.
24. Dickert. F.L, Lieberzeit. P, Tortschanoff. M., *Sensors and Actuators B*, **65** (2000) 186.
25. Klein. J. U, Whitcombe. M. J, Mulholland. F, Vulfson. E. N., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **38** (1999) 2057.
26. Steinke. J. H. G, Dunkin. I.R, Sherrington. D. C, *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999) 159.
27. Haupt. K., *Chem. Comm.*, **2** (2003) 171.
28. Alexander. C, Davidson. L, Hayes. W., *Tetrahedron* **59** (2003) 2025.
29. Svenson. D, Nicholls. I. A., *Anal. Chim. Acta*, **435** (2001) 19.
30. Wulff. G., *Polymeric Reagents and Catalysts* (Ed. W.T. Ford) (ACS Symp. Ser. **208** (1986) 186).
31. Andersson. L, Sellergren. B, Mosbach. K., *Tetrahedron Lett.*, **25** (1984) 5211.
32. Spivak. D, Shea. K.J., *J. Org. Chem.*, **64** (1999) 4627.
33. Ramstron. O, Andersson. L.I, Mosbach. K., *J. Org. Chem.*, **58** (1993) 7562.
34. Kempe. M, Fisher. L, Mosbach. K., *J. Mol. Recogn.*, **6** (1995) 25.
35. Simon. R. L, Spivak. D.A., *J. Chromatogr. B*, **804** (2004) 203.
36. Sellergren. B., *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999) 164.
37. Sellergren. B, Shea. K.J., *J. Chromatogr. A*, **635** (1993) 31.
38. Pande. V. S, Grosberg. A. Y, Tanaka. T., *Physica D*, **107** (1997) 316.
39. Nicholls. I. A, Adbo. K, Andersson. H. S, Andersson. P. O., *Anal. Chim. Acta*, **435** (2001) 9.
40. Batra. D, Shea. K.J., *Current opinion in Chemical Biology*, **7** (2003) 1.
41. Dirion. B, Cobb. Z, Schillinger. E; Andersson. L.I, Sellergren. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (2003) 15101.
42. Lanza. F, Sellergren. B., *Anal. Chem.*, **71** (1999) 2092.

43. El-Toufaili El. F-A, Visnjevski. A, Brüggemann. O., *J. Chromatogr. B*, **804** (2004) 135.
44. Takeuchi. T, Fukuma. D, Matsui. J., *Anal. Chem.*, **71** (1999) 285.
45. Navarro-Villoslada. F; San Vicente. B; Moreno-Bondi. MC., *Anal. Chim. Acta*, **504** (2004) 149.
46. Baggiani. C, Anfossi. L, Giovannoli. C, Tozzi. C., *J. Chromatogr. B*, **804** (2004) 31.
47. Davies. M. P, De Biasi. V, Perrett. D., *Anal. Chim. Acta*, **504** (2004) 7.
48. Chianella. I, Lotierzo. M, Piletsky. S. A, Tohill. I. E, Chen. B.N, Karim. K, Turner. A.P.F., *Anal. Chem.* **74** (2002) 1288.
49. Piletsky. S. A, Karim. K, Piletska. E. V, Day. C. J, Freebairn. K.W, Legge. C, Turner. A. P: F., *Analyst*, **126** (2001) 1826.
50. Subrahmanyam. S, Piletsky. S. A, Piletska. E. V, Chen. B, Karim. K, Turner A. P. F., *Biosens. Bioelectr.* **16** (2001) 631.
51. Piletsky. S, Piletska. E, Karim. K, Foster. G, Legge. C, Turner. A, *Anal. Chim. Acta*, **504** (2004) 123.
52. Piletska. E, Piletsky. S, Karim. K, Terpetschnig. E, Turner. A., *Anal. Chim. Acta*, **504** (2004) 179.
53. Piletska. E. V, Romero-Guerra. M, Chianella. I, Karim. K, Turner. A.P.F., Piletsky. A., *Anal. Chim. Acta*, **542** (2005) 111.
54. Piletska. E, Turner. N. W, Turner. A. P. F, Piletsky. S., *Journal of Controlled Release*, **108** (2005) 132.
55. Chianella. I, Karim. K, Piletska. E. V, Preston. C, Piletsky. S. A., *Anal. Chim. Acta*, **559** (2006) 73.
56. Monti. S, Cappelli. C, Bronco. S, Giusti. P, Ciardelli. G., *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2006) 153.
57. Farrington. K, Magner. E, Regan. F., *Anal. Chim. Acta*, **566** (2006) 60.
58. Laug. W. E, Siegel. S. E, Shaw. K. N. F, Landing. B, Baptista. J, Gutenstein. M., *Pediatrics*, **62** (1978) 1.

59. Krstulovic. A.M., *Quantitative Analysis of Catecholamines and Related Compounds*. Ellis Horwood, Chichester, UK (1986).
60. Anderson S. C, Cockayne S., *Clinical Chemistry* W.B. Saunders Company Philadelphia, (1993).
61. Monsaingeon. M, Perel. Y, Simonnet. G, Corcuff. J-B., *Eur. J. Pediatr.*, 162 (2003) 397.
62. Hildebrandt. T, Traunecker. H., *Current Paediatrics*, **15** (2005) 412.
63. Nakawara. A, Zaizen. Y, Ikeda. K, Suita. S, Ohgami. H, Nagahara. N, Sera. Y, Akiyama. H, Kawakami. K, Uchino. J., *Cancer*, **68** (1991) 2037.
64. Imahuku. S, Takada. H, Sawada. T, Nakamura.T, LaBrosse. E.H., *Cancer*, **36** (1975) 452.
65. Simon. T, Hero. B, Hunneman. D.H, Berthold. F., *European Journal of Cancer*, **39** (2003) 1899.
66. Suita. S, Akazawa. K, Sera.Y, Takamatsu. H, Mizote. H., *Journal of Pediatric Surgery*, **33** (1998) 1674.
67. Kawakami. T, Monobe. Y, Monforte. H, Woods. W.G, Tuchman. M., *Cancer*, **83** (1988) 575.
68. Oue. T, Inoue. M, Yoneda. A, Kubota. A, Okuyama. H., *Journal of Pediatric Surgery*, **40** (2005) 359.
69. Erttmann. R, Tafese. T, Berthold. F, Kerble. R, Mann. J, Parker. L., *European Journal of Cancer*, **34** (1998) 1391.
70. Sumiyashi. T, Kurachi. M, Itoh. H., *Neuropsychopharmacology*, **23** (2000) 347.
71. Galinowsky. A, Castelnau. C, Spreux-Varoquaux. O, Bourdel. M.C, Olie. J.P, Loo. H, Poirier. M.F., *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.*, **24** (2000) 1319.
72. Siever. L. J, Davies. K. L., *Am. J. Psychiatry*, **161** (2004) 398.
73. Marcelis. M, Suckling. J, Hofman. P., Woodruff. P, Bullmore. E, van Os. J., *Schizophrenia Research*, **86** (2006) 45.

74. Orange. B, Bijl. S, Campagne. A, Gispen-de-Wied. C.C., *Neuropsychopharmacology*, **23** (2000) 345.
75. Knight .J. A, Fronk. S, Haymond. R. E., *Clin. Chem.*, **21** (1975) 130.
76. Morrisey. J. L, Shihabi. Z. K., *Clin. Chem.*, **25** (1979) 2043.
77. Rosano. T. G, Brown. H. H, Meola. J. M., *Clin. Chem.*, **27** (1981) 228.
78. Hanai. J, Kawai. T, Seto. Y, Takasugi. N, Nishi. M, Takeda. T., *Clin. Chem.*, **33** (1987) 2043.
79. Kinoshita. Y, Yamada. S., *Clin. Chem.*, **34** (1988) 2228.
80. Fujita. K, Maruta. K, Ito. S, Nagatsu. T., *Clin. Chem.*, **29** (1983) 876.
81. Adcock. J.L, Barnett. N.W, Costin. J.W, Francis. P.S, Lewis. S.W., *Talanta*, **67** (2005) 585.
82. Soldin. S.J, Hill. J.G., *Clin. Chem.*, **26** (1980) 291.
83. Taran. F, Bernard. H, Valleix. A, Créminon. C, Grassi. J, Olichon. D, Deverre. J-R, Pradelles. P., *Clin. Chim. Acta*, **264** (1997) 177.
84. Shi. R. Z, Ho. Y-P, Yeung. J. H. K, Yu Or. P. M, Wah To. K. K, Lau. M. W. M, Arumanayagam. M., *Clin. Chem.*, **44** (1998) 1674.
85. Brewster. M.A, Berry. D. H, Moriarty. M., *Clin. Chem.*, **23** (1977) 2247.
86. Leiendecker-Foster. C, Freier. E. F., *Clin. Chem.*, **27** (1981) 2029.
87. Tuchman. M, Crippin. P.J, Krivit. W., *Clin. Chem.*, **29** (1983) 828.
88. Seviour. J.A, McGill. A. C, Dale. G., *J. Chromatogr.*, **432** (1988) 273.
89. Lorenzelli. L, Benvenuto. A, Adami. A, Guarnieri. V, Margesin. B, Mulloni. V, Vincenzi. D., *Biosens. Bioelectron.*, **20** (2005) 1968.
90. Dale. G, McGill. A. C, Seviour. J. A, Craft. A.W., *Ann. Clin. Biochem.*, **25** (1988) 233.
91. Shirao. M. K, Suzuki. S, Kobayashi. J, Nakazawa. H, Mochizuki. E., *J. Chromatogr. B*, **693** (1997) 463.
92. Bergquist. J, Sciubisz. A, Kaczor. A, Siberring. J., *J. Neurosci. Methods*, **113** (2002).
93. García. A, Heinänen. M, Jiménez. L. M, Barbas. C., *J. Chromatogr. A*, **871** (2000) 341.

94. Sirén. H, Mielonen. M, Herlevi. M., *J. Chromatogr. A*, **1032** (2004) 289.
95. Britz-McKibbin. P, Chen D.D.Y., *Anal. Chem.*, **72** (2002) 1242.
96. Issaq. H. J, Delviks. K, Janini. G. M, Muschik. G. M., *J. Liq. Chromatogr.*, **15** (1992) 3193.
97. Levine. I. N., *Química Cuántica*. Prentice Hall (2001).
98. Roothaan. C. C. J., *Rev. Mod. Phys.*, **23** (1951) 69.
99. Pople. J. A., (a) *Proc. Roy. Soc.*, **A 205** (1951) 163; (b) *Proc. Roy. Soc.*, **A 239** (1957) 550; (c) *Proc. Roy. Soc.*, **A 239** (1957) 541.
100. Kohn. W, Sham. L. J., *Phys. Rev.*, **140** (1965) A 1133.
101. Vosko. S. H, Wilk. L, Nusair. M., *Can. J. Phys.*, **58** (1980) 1200.
102. Becke. A. D., *J. Chem. Phys.*, **98** (1993) 5648.
103. Lee. C. T, Yang. W. T, Parr. R. G., *Phys. Rev. B*, **37** (1988) 785.
104. McQuarrie D.A., *Statistical Mechanics*. Susalito, California (1986).
105. Frisch, M. J; Trucks, G. W.; Schelegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.;Montgomery, J., J.A.; Stratmann, R.E.; Burant, J.C.; Dapprich, S.; Mim, J.M.; Daniels, A.D.; Kudin, K.N.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Camni, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C. Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G.A.; Ayala, P.Y.; Cui, Q.; Morouma, K.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J.V.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liasgebjim A; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; González, C.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wrong, M.W.; Andres, J.L.; González, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E.S.; Pople, J.A.; *Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA* (1998).
106. Lanza. F, Sellergren. B., *Anal. Chem.*, **71** (1999) 2092.
107. Lanza. F, Hall. A. J, Sellergren. B, Bereczki. A, Horvai. G, Cormack. S, Sherrington. P. A. G., *Anal. Chim. Acta*, **435** (2001) 91.

108. Dirion. B, Cobb. Z, Schillinger. E, Andersson. L. I, Sellergren. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (2003) 15101.
109. Sellergren. B, Lepisto. M, Mosbach. K., *J. Am. Ceram. Soc.* **111** (1998) 3442.
110. Salvador. J. P, Estévez. M. C, Marco. M. P, Sánchez-Baeza. F., *Anal. Lett.*, **40** (2007) 1294.
111. O'Mahony. J, Molinelli. A, Nolan. K, Smyth. M. R, Mizaikiff. B., *Biosens. Bioelectron.* **21** (2006) 1383.
112. Takeuchi. T, Dobashi. A, Kimura. K, Als. K, Adbo. H. S., *Anal. Chem.* **72** (2000), 2418.
113. Liu. Y, Wang. F, Tan. T, Lei. M., *Anal. Chim. Acta*, **581** (2007) 137.
114. Meng. Z, Yamazaki. T, Sode. K., *Biosens. Bioelectron.*, **20** (2004) 1008.
115. Mukawa. T, Goto. T, Nariai. H, Aoki. Y, Imamura. A, Takeuchi. T., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30** (2003) 1943.
116. Wu. L, Sun. B, Li. Y, Chang. W., *Analyst*, **128** (2003) 944.
117. Diñeiro. Y, Menéndez. M. I, Blanco López. M. C, Lobo Castañón. M. J, Miranda Ordieres. A. J, Tuñón Blanco. P., *Anal. Chem.*, **77** (2005) 6741.
118. Dong. W, Yan. M, Zhang. M, Liu. Z, Li. Y., *Anal. Chim. Acta*, **542** (2005) 186.
119. Azenha. M, Kathirvel. P, Nogueira. P, Fernando-Silva. A., *Biosens. Bioelectron.*, **23** (2008) 1843.
120. Wu. L, Zhu. K, Zhao. M, Li. Y., *Anal. Chim. Acta*, **549** (2005) 39.
121. Yao. J, Li. X, Qin. W., *Anal. Chim. Acta*, **610** (2008) 282.
122. Dong. W, Yan. M, Liu. Z, Wu. G, Li. Y., *Separation and Purification Technology*, **53** (2007) 183.
123. Matsui. J., *Anal. Chem.*, **67** (1995) 4404.
124. Matsui. J, Fujiwara. K, Takeuchi. T., *Anal. Chem.*, **72** (2000) 1810.
125. Wang. H-Y, Jiang. J-G, Ma. L-Y, Pang. Y-L., *Reactive and Functional Polymers*, **64** (2005) 119.

126. Wang. H-Y, Jiang. J-G, Ma. L-Y, Pang. Y-L., *Reactive and Functional Polymers*, **66** (2006) 1081.
127. Knight. J. A, Haymond. R.E., *Clin. Chem.*, **23** (1977) 2007.
128. Wistuba. D, Schurig. V., *J. Chromatogr. B*, **875** (2000) 255.
129. Kempe. M, Mosbach. K., *J. Chromatogr. A*, **694** (1995) 3.
130. Hwang, C-C; Lee, W. C., *J. Chromatogr. A*, **962** (2002) 69.
131. Haginaka, J; Kagawa, C., *J. Chromatogr. A*, **948** (2002) 77.
132. Prasad. B. B, Banerjee. S., *Reactive & Functional Polymers*, **55** (2003) 159.
133. Tamayo. F. G, Titirici. M. M, Martin-Esteban. A, Sellergren. B., *Anal. Chim. Acta*, **542** (2005) 38.
134. Jiang. M, Zhang. J, Mei. S, Shi. Y, Zou. L, Zu. Y, Dai. K, Lu. B., *J. Chromatogr. A*, **1110** (2006) 27.
135. Takeuchi. T, Haginaka. J., *J. Chromatogr. B*, **728** (1999) 1.
136. Schwitz. L, Spegel. P, Nilsson. S., *Electrophoresis*, **22** (2001) 4053.
137. Turiel. E, Martin-Esteban. A., *Anal. Bioanal. Chem*, **378** (2004) 1876.
138. Xu. Y, Liu. Z, Wang. H, Yan. C, Gao. R., *Electrophoresis*, **26** (2005) 804.
139. Ou. J, Li. X, Feng. S, Dong. J, Dong. X, Kong. L, Ye. M, Zou. H., *Anal. Chem.*, **79** (2007) 639.
140. Andersson. L.I., *J. Chromatogr. B*, **739** (2000) 163.
141. Andersson. L.I., *Analyst*, **125** (2000) 1515.
142. Pap. T. Horváth. V, Tolokán. A, Horvay. G, Sellergren. B., *J. Chromatogr.. A*, **973** (2002) 1.
143. Mena. M.L, Martínez-Ruiz. P, Reviejo. A. J, Pingarrón. J. M., *Anal. Chim. Acta*, **451** (2002) 297.
144. Caro. E, Masqué. N, Marcé. R. M, Borrull. F, Cormack. P. A. G, Sherrington. D. C., *J. Chromatogr. B*, **963** (2002) 169.
145. Lai. E.P.C, Wu. S.G., *Anal. Chim. Acta*, **481** (2003) 165.
146. Chapuis. F, Pichon. V, Lanza. F, Sellergren. B, Hennion. M-C, *J. Chromatogr. A*, **999** (2003) 23.

147. Chapuis. F, Pichon. V, Lanza. F, Sellergren. B, Hennion. M-C, *J. Chromatogr. B*, **804** (2004) 93.
148. Xu. X, Zhu. L, Chen. L., *J. Chromatogr. A*, **804** (2004) 61.
149. Caro. E, Marcé. R. M, Borrull. F, Cormack. P. A. G, Sherrington. D. C., *Trends Anal. Chem.*, **25** (2006) 143.
150. Guerreiro. A, Soares. A, Piletska. E, Mattiasson. B, Piletsky. S., *Anal. Chim. Acta*, **612** (2008) 99.
151. Piletsky. S. A, Panasyuk. T. L, Piletskaya. E. V, Nicholls. I. A, Ulbricht. M., *Journal of Membrane Science*, **157** (1999) 263.
152. Marx. S, Liron. Z., *Chem. Mater.*, **13** (2001) 3624.
153. Mirsky. V. M, Panasyuk-Delaney. T, Wolfbeis. O. S., *Biol. Membr.*, **18** (2001) 496.
154. Yoshimi. Y, Ohdaira. R, Iiyama. C, Sakai. K., *Sensors and Actuators B*, **73** (2001) 49.
155. Trotta. F; Drioli. E; Baggiani. C; Lacopo. D., *Journal of Membrane Science*, **201** (2002) 77.
156. Duffy. D. J, Das. K, Hsu. S. L, Penelle. J, Rotello. V. M, Sitdham. H. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002) 8290.
157. Lin. C.I, Joseph. A.K, Chang. C.K, Lee. Y.D., *J. Chromatogr. A*, **1027** (2004) 259.
158. Huan. S, Chu. H, Jiao. C, Zeng. G, Huang. G, Shen. G, Yu. R., *Anal. Chim. Acta*, **506** (2004) 31.
159. Ulbricht. M., *J. Chromatogr. B*, **804** (2004) 113.
160. Trotta. F, Baggiani. C, Luda. M. P, Drioli. E, Massari. T., *Journal of Membrane Science*, **254** (2005) 13.
161. Piacham. T, Josell. A, Arwin. H, Prachayasittikul. V, Ye. L., *Anal. Chim. Acta*, **536** (2005) 191.
162. Zhu. X, Su. Q, Cai. J, Yang. J, Gao. Y., *Journal of Applied Polymer Science*, **101** (2006) 4468.
163. Takeda. K, Uemura. K, Kobayashi. T., *Anal. Chim. Acta*, **591** (2007) 40.

Bibliografía

164. Piletsky. S. A, Piletska. E. V, Bossi. A, Karim. K, Lowe. P, Turner. A. P. F., *Biosens. Bioelectron.*, **16** (2001) 701.
165. Prasad. B, Tiwari. K, Singh. M, Sharma. P, Patel. A, Srivastava. S., *J. Chromatogr. A*, **11** (2008) 59.
166. Paniagua-González. G, Fernández-Hernando. P, Durand-Alegría. J. S., *Biosens. Bioelectron.*, **23** (2008) 1754.
167. Javanbakht. M, Fard. S, Mohammadi. A, Abdouss. M, Ganjali. M, Norouzi. P and Safaraliee. L., *Anal. Chim. Acta*, **612** (2008) 65.
168. Thoelen. R, Vansweevelt. R, Duchateau. J, Horemans. F, D'Haen. J, Lutsen. L, Vanderzande. D, Ameloot. M, Wagner. P., *Biosens. Bioelectron.*, **23** (2008) 913.
169. Prasad. B, Sharma. P, Lakshmi. D., *J. Chromatogr. A*, **1173** (2007) 18.
170. Kitade. T, Kitamura. K, Konishi. T, Shigehiko. T, Okuno. T, Ishikawa. M, Wakabayashi. M, Nishikawa. K, Muramatsu. Y., *Anal. Chem.*, **76** (2004) 6802.
171. Sellergren. B, Andersson. L.I., *Methods*, **22** (2000) 92.
172. Haupt. K., *Reactive & Functional Polymers*, **41** (1999) 125.
173. Luppa. P, Sokoll. L, Chan. D., *Clin. Chim. Acta*, **314** (2001) 1.
174. Ansell. R.J., *Bioseparation*, **10** (2002) 365.
175. Ye. Lei, Haupt. K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **378** (2004) 1887.
176. Yilmaz. E, Mosbach. K, Haupt. K., *Anal. Commun.*, **36** (1999) 167.
177. Piletska. E, Piletsky. S, Karim. K, Terpetschnig. E, Turner. A., *Anal. Chim. Acta*, **504** (2004) 179.
178. Umpleby. R. J, Baxter. S. C, Chen. Y, Shah. R. N, Shimizu. K. D., *Anal. Chem.*, **73** (2001) 4584.
179. Umpleby. R. J, Baxter. S. C, Bode. M, Berch Jr. J. K, Shah. R. N., Shimizu. K.D., *Anal. Chim. Acta*, **435** (2001) 35.
180. Turiel. E, Perez-Conde. C, Martin-Esteban. A., *Analyst*, **128** (2003) 137.
181. Kim. H, Spivak. D. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (2003) 11269.

182. Rampey. A. M, Umpleby. R. J, Rushton. G. T, Iseman. J. C, Shah. R. N, Shimizu. K. D., *Anal. Chem.*, **76** (2004) 1123.
183. Asanuma. H, Akiyama. T, Kajiya. K, Hishiya. T, Komiyama. M., *Anal. Chim. Acta*, **435** (2001) 25.
184. Umpleby. R. J, Baxter. S. C, Rampey. A. M, Rushton. G. T, Chen. Y, Shimizu. K. D., *J. Chromatogr. B*, **804** (2004) 141.
185. Baggiani. C, Giraudi. G, Giovannoli. C, Tozzi. C, Anfossi. L., *Anal. Chim. Acta*, **504** (2004) 43.
186. Lehmann. M, Dettling. M, Brunner. H, Tovar. G. E. M., *J. Chromatogr. B*, **808** (2004) 43.
187. Hiratani. H, Alvarez-Lorenzo. C., *Biomaterials*, **25** (2004) 1105.
188. Pap. T, Horvai. G., *J. Chromatogr. B*, **804** (2004) 167.
189. Toth. B, Pap. T, Horvath. V, Horvai. G., *J. Chromatogr. A*, **1119** (2006) 29.
190. Rushton. G, Karns. C, Shimizu. K., *Anal. Chim. Acta*, **528** (2005) 107.
191. Shea. K.J, Spivak. D.A, Sellergren. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993) 3368.
192. Matsui. J, Miyoshi. Y, Doblhoff-Dier. O, Takeuchi. T., *Anal. Chem.*, **67** (1995) 4404.
193. Allender. C. J, Brain. K. R, Heard. C. M., *Chirality*, **9** (1997) 233.
194. Baggiani. C, Giraudi. G, Giovannoli. C, Tozzi. C, Anfossi. L., *Anal. Chim. Acta*, **504** (2004) 43.
195. Sajonz. P, Kele. M, Zhong. G, Sellergren. B, Guiochon. G., *J. Chromatogr. A*, **810** (1998) 1.
196. Chen. Y, Kele. M, Quiñones. I, Sellergren. B, Guiochon. G., *J. Chromatogr. A*, **927** (2001) 1.
197. Chen. Y, Sajonz. P, Kele. M. P, Sellergren. B, Guiochon. G., *Anal. Chem.*, **71** (1999) 928.
198. Umpleby. R. J, Bode. M, Shimizu. K.D., *Analyst*, **125** (2000) 1261.
199. Sellergren. B, Shea. K.J., *J. Chromatogr. A*, **690** (1995) 29.
200. Wulff. G., *Chem. Rev.*, **102** (2002) 1.

201. Re. N., *J. Colloid Interface Sci.*, **166** (1994) 191.
202. Hunston. D.L., *Anal. Biochem.*, **63** (1975) 99.
203. Sternson. A.W, McCreery. R, Feinberg. B, Adams R.N., *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **46** (1973) 313.
204. Petek. M., Bruckenstein. S., *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **42** (1973) 397.
205. Mijangos. I, Navarro-Villoslada. F, Guerreiro. A, Piletska. E, Chianella. I, Karim. K, Turner. A, Piletsky. S., *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2006) 381.
206. Davies. M. P, De Biasi. V, Perrett. D., *Anal. Chim. Acta*, **504** (2004) 7.
207. Navarro-Villoslada. F, San Vicente. B, Moreno-Bondi. M. C., *Anal. Chim. Acta*, **504** (2004) 149.
208. Koohpaeia. A. R, Shahtaherib. S. J, Ganjalic. M. R, Rahimi Forushanid. A, Golbabaei. F., *Talanta*, **75** (2008) 978.
209. Zhu. Q-Z, Haupt. K, Knopp. D, Niessner. R., *Anal. Chim. Acta*, **468** (2002) 217.
210. Lu. Y, Li. C, Wang. X, Sun. P, Xing. X., *J. Chromatogr. B*, **804** (2004) 53.
211. Sellergren. B., *Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*. Elsevier Science BV. (2001).
212. Mijangos. I, Navarro-Villoslada. F, Guerreiro. A, Piletska. E, Chianella. I, Karim. K, Turner. A, Piletsky. S., *Biosen. Bioelectron.*, **22** (2006) 381.
213. Ensing. K, de Boer. T., *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999) 139.
214. Owens. P. K, Karlsson. L, Lutz. E. S. M, Andersson. L. I., *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999)146.
215. Stevenson. D., *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999) 154.
216. Masqué. N, Marcé. R. M, Borrull. F., *Trends Anal. Chem.*, **20** (2001) 477.

217. Andersson. L. I., *J. Chromatogr. B*, **739** (2000) 163.
218. Andersson. L. I., *J. Chromatogr. B*, **745** (2000) 3.
219. Mullett. W. M, Lai. E. P. C., *Anal. Chem.*, **70** (1998) 3636.
220. Chen. W, Liu. F, Xu. Y, Li. K, Tong. S., *Anal. Chim. Acta*, **432** (2001) 277.
221. Kempe. M, Mosbach. K. J., *J. Chromatogr. A*, **694** (1995) 3.
222. Andersson. L. I., *Anal. Chem.*, **68** (1996) 111.
223. Vlatakis. G, Andersson. L. I, Muller. R, Mosbach. K., *Nature*, **361** (1993) 645.
224. Takeuchi. T, Dobashi. A, Kimura. K., *Anal. Chem.*, **72** (2000) 2418.
225. Surugiu. I, Ye. L, Yilmaz. E, Danielsson. B, Mosbach. K, Haupt. K., *Analyst*, **125** (2000) 13.
226. Sellergren. B., *Trends Anal. Chem.*, **16** (1997) 310.
227. Ramstrom. O, Yo. C, Mosbach. K., *J. Mol. Recogn.*, **9** (1996) 691.
228. Haupt. K, Mosbach. K., *Chem. Rev.*, **100** (2000) 2495.
229. Dickert. F.L, Hayden. O., *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999) 192.
230. Kriz. D, Ramstrom. O, Mosbach. K., *Anal. Chem.*, **69** (1997) 345A.
231. Percival. C.J, Stanley. S, Galle. M, Braithwaite. A, Newton. M.I, McHale. G, Hayes. W., *Anal. Chem.*, **73** (2001) 4225.
232. Tan. Y, Nie. L, Yao. S., *Analyst*, **126** (2001) 664.
233. Kugimiya. A, Takeuchi. T., *Electroanalysis*, **11** (1999) 1158.
234. Dickert. F. L, Hayden. O, Halikias. K. P., *Analyst*, **126** (2001) 766.
235. Kobayashi. T, Murawaki. Y, Reddy. P.S, Abe. M, Fujii. N., *Anal. Chim. Acta*, **435** (2001) 141.
236. Peng. H, Liang. C, Zhou. A, Zhang. Y, Xie. Q, Yao. S., *Anal. Chim. Acta*, **423** (2000) 221.
237. Liang. C, Peng. H, Bao. X, Nie. L, Yao. S., *Analyst*, **124** (1999) 1781.
238. Liang. C, Peng. H, Zhou. A, Nie. L, Yao. S., *Anal. Chim. Acta*, **415** (2000) 135.
239. Tan. Y, Zhou. Z, Wang. P, Nie. L, Yao. S., *Talanta*, **55** (2001) 337.

Bibliografía

240. Liao. H, Zhang. Z, Li. H, Nie. L, Yao. S., *Electrochim. Acta*, **49** (2004) 4101.
241. Liao. H, Zhang. Z, Li. H, Nie. L, Yao. S., *Sensors and Actuators B*, **105** (2005) 176.
242. Sun. H, Fung. Y., *Anal. Chim. Acta*, **576** (2006) 67.
243. Ávila. M, Zougagh. M, Ríos. A, Escarpa. A., *Trends Anal. Chem.*, **27** (2008) 54.
244. Dickert. F, Tortschanoff. M, Bulst. W. E, Fisherauer. G., *Anal. Chem.*, **71** (1999) 4559.
245. Suárez-Rodríguez. J. L, Díaz-García. M. E., *Anal. Chim. Acta*, **405** (2000) 67.
246. Piletsky. S. A, Piletskaya. E. V, Yano. K, Kugimiya. A, Elgersma. A. V, Levi. R, Kahlow. V, Takeuchi. T, Karube. I, Panesyuk. T.Y, El'skaya. A. V., *Anal. Lett.*, **29** (1996) 157.
247. McNiven. S, Kato. M, Levi. R, Yano. K, Karube. I., *Anal. Chim. Acta*, **365** (1998) 69.
248. Jenkins. A, Uy. O.M, Murray. G. M., *Anal. Chem.*, **71** (1999) 373.
249. Chen. Y. C, Brazier. J, Yan. M, Bargo. P. R, Prah. S. A., *Sensors and Actuators B*, **102** (2004) 107.
250. Piletsky. S. A, Turner. A. P. F., *Electroanalysis*, **14** (2002) 317.
251. Merkoçi. A, Alegret. S., *Trends Anal. Chem.*, **21** (2002) 717.
252. Huan. S, Shen. G, Yu. R., *Electroanalysis*, **16** (2004) 1019.
253. Lange. U, Roznyatovskaya. N. V, Mirky. V. M., *Anal. Chim. Acta*, **614** (2008) 1.
254. Iwuoha. E. I, Villaverde. D. S, García. N. P, Smyth. M. R, Pingarrón. J. M., *Biosens. Bioelectron.*, **12** (1997) 749.
255. Malitesta. C, Losito. I, Zambonin. P. G., *Anal. Chem.*, **77** (1999) 1366.
256. Gong. J-L, Gong. F-C, Zeng. G-M, Shen. G-L, Yu. R-Q., *Talanta*, **61** (2003) 447.

257. Shiigi. H, Yakabe. H, Kishimoto. M, Kijima. D, Zhang. Y, Sree. U, Deore. A, Nagaoka. T., *Microchim. Acta*, **143** (2003) 155.
258. Weetall. H. H, Rogers. K. R., *Talanta*, **62** (2004) 329.
259. Ionescu. R. E, Gondran. C, Gheber. L, Cosnier. S, Marks. R. S., *Anal. Chem.*, **76** (2004) 6808.
260. Liao. H, Zhang. Z, Li. H, Nie. L, Yao. S., *Electrochim. Acta*, **49** (2004) 4101.
261. Feng. L, Liu. Y, Tan. Y, Hu. J., *Biosens. Bioelectron.*, **19** (2004) 1513.
262. Ulyanova. Y. V, Blackwell. A. E, Minter. S. D., *Analyst*, **131** (2006) 257.
263. Özcan. L, Şahin. Y., *Sensors and Actuators B*, **127** (2007) 362.
264. Gómez-Caballero. A, Unceta. N, Goicolea. A, Barrio. R. J., *Sensors and Actuators B*, **130** (2008) 713.
265. Gómez-Caballero. A, Goicolea. A, Barrio, R. J., *Analyst*, **130** (2005) 1012.
266. Weng. C. H, Yeh. W-M, Ho. H-K, Lee. G. B., *Sensors and Actuators B*, **121** (2007) 576.
267. Mazzotta. E, Picca. R. A, Malitesta. C, Piletsky. S. A, Piletska. E. V., *Biosens. Bioelectron.*, **23** (2008) 1152.
268. Pingarrón. J. M, Yáñez-Sedeño. P, González-Cortés. A., *Electrochim. Acta*, **53** (2008) 5848.
269. Cabello-Carramolino. G, Petit-Dominguez. M. D., *Anal. Chim. Acta*, **614** (2008) 103.
270. Maduraiveeran. G, Ramaraj. R., *J. Electroanal. Chem.*, **608** (2007) 52.
271. Maroneze. C. M, Arenas. L. T, Luz. R, Benvenutti. E, Landers. R, Gushikem. Y., *Electrochim. Acta*, **53** (2008) 4167.
272. Huan. S, Hu. S, Shen. G, Yu. R., *Anal. Letters*, **36** (2003) 2401.
273. Blanco López. M. C, Lobo Castañón. M. J, Miranda Ordieres. A. J, Tuñón Blanco. P., *Trends Anal. Chem.*, **23** (2004) 36.

Bibliografía

274. Diltemiz. S. E, Say. R, Büyüktiryaki. S, Hür. D, Denizli. A, Ersöz. A., *Talanta* **75** (2008) 890.
275. Loaiza. O. A, Campuzano. S, Pedrero. M, Pingarrón. J. M., *Talanta*, **73** (2007) 838.
276. Kriz. D, Mosbach. K., *Anal. Chim. Acta*, **300** (1995) 71.
277. Kroger. S, Turner. A. P. F., Mosbach. K, Haupt. K., *Anal. Chem.* **71** (1999) 3698.
278. Kirsch. N, Hart. J. P, Bird. D. J, Luxton. R. W, McCalley. D. V., *Analyst*, **126** (2001) 1936.
279. Pizzariello. M, Stre'ansky. S, Stred'anska. S, Miertus. S., *Sensors and Actuators B*, **76** (2001) 286.
280. Yamazaki. T, Meng. Z, Mosbach. K, Sode. K., *Electrochemistry*, **69** (2001) 969.
281. Thoelen. R, Vansweevelt. R, Duchateau. J, Horemans. F, Haen. J, Lutsen. L, Vanderzande. D, Ameloot. M, vande Ven. M, Cleij. T. J, Wagner. P., *Biosens. Bioelectron.*, **23** (2008) 913.
282. Kan. X, Zhao. Q, Zhang. Z, Wang. Z, Zhu. J-J., *Talanta*, **75** (2008) 22.
283. Kan. X, Zhao. Y, Geng. Z, Wang. Z, Zhu. J-J., *J. Phys. Chem. C*, **112** (2008) 4849.
284. Hedborg. E, Winqvist. F, Lundstrom. I, Andersson. L.I, Mosbach. K., *Sensors and Actuators A*, **37** (1993) 796.
285. Piletsky. S. A, Piletskaya. E.V, Elgersma. A. V, Yano. K, Karube. I, Parhometz. Y. P, El'skaya. A. V., *Biosens. Bioelectron.*, **10** (1995) 959.
286. Piletsky. S. A, Piletskaya. E. V., Panasyuk. T. L, El'skaya. A. V, Levi. R, Karube. I, Wulff. G., *Macromolecules*, **31** (1998) 2137.
287. Sergeeva. T. A, Piletsky. S. A, Brovko. A. A, Slichenko. E. A, Sergeeva. L. M, Panasyuk. T. L, El'skaya. A. V., *Analyst*, **124** (1999) 331.

288. Sergeeva. T. A, Piletsky. S. A, Brovko. A. A, Slichenko. E. A, Sergeeva. L. M, El'skaya. A.V., *Anal. Chim. Acta*, **392** (1999) 105.
289. Yoshimi. Y, Ohdaira. R, Iiyama. C, Sakai. K., *Sensors and Actuators B*, **73** (2001) 49.
290. Panasyuk-Delaney. T, Mirsky. V.M, Ulbricht. M, Wolfbeis. O.S., *Anal. Chim. Acta*, **435** (2001) 157.
291. Panasyuk-Delaney. T, Mirsky. V.M, Wolfbeis. O.S., *Electroanalysis*, **14** (2003) 221.
292. Blanco-López. M. C, Lobo-Castañón. M. J, Miranda-Ordieres. A. J, Tuñón-Blanco. P., *Biosens. Bioelectron.*, **18** (2003) 353.
293. Shoji. R, Takeuchi. T, Kubo. I., *Anal. Chem.*, **75** (2003) 4882.
294. Kindschy. L. M, Alocilja. E. C., *Biosens. Bioelectron.*, **20** (2005) 2163.
295. Huang. C-Y, Syu. M-J, Chang. Y-S, Chang. C-H, Chou. T-C, Liu. B-D., *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2007) 1694.
296. Kobayashi. T, Murawaki. Y, Reddy. P. S, Abe. A, Fujii. N., *Anal. Chim. Acta*, **435** (2001) 141.
297. Blanco-López. M. C, Lobo-Castañón. M. J, Miranda-Ordieres. A. J, Tuñón-Blanco. P., *Anal. Bioanal. Chem.*, **378** (2004) 1922.
298. Percival. C. J, Stanley. S, Braithwaite. A, Newton. M. I, McHale. G., *Analyst*, **127** (2002) 1024.
299. Ebarvia. B. S, Binag. C. A, Sevilla. F., *Anal. Bioanal. Chem.*, **378** (2004) 1331.
300. Jiang. P, McFarland. M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (2004) 13778.
301. Belmont. A-S, Jaeger. S, Knopp. K, Niessner. R, Gauglitz. G , Haupt. K., *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2007) 3267.
302. Haupt. K, Noworyta. K, Kutner. W., *Anal. Commun.*, **36** (1999) 391.
303. Liang. C, Peng. H, Zhou. A, Nie. L, Yao. S., *Anal. Chim. Acta*, **415** (2000) 135.
304. Liang. C, Peng. H, Bao. X, Nie. L, Yao. S., *Analyst*, **124** (1999) 1781.
305. Jenkins. A, Uy. O. M, Murray. G. M., *Anal. Chem.*, **71** (1999), 373.
306. Jenkins. A, Yin. R, Jensen. J. L., *Analyst*, **126** (2001), 798.

Bibliografía

307. Dickert. F, Tortschanoff. M, Bulst. W. E, Fischerauer. G., *Anal. Chem.*, **71** (1999) 4559.
308. Schmidt. R.H, Belmont. A-S, Haupt. K., *Anal. Chim. Acta*, **542** (2005) 118.
309. Schmidt. R.H, Mosbach. K, Haupt. K., *Adv. Mater.*, **8** (2004) 719.
310. Schmidt. R.H, Haupt. K., *Chem. Mater.* **17** (2005) 1007.
311. Ikeda. T, Schmehl. R, Denisevich. P, Willman. K, Murray. R. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **104** (1982) 2683.
312. Preesprich. K.A, Maybury. S. G, Thormas. R. E, Linton. R. W, Irene. E. A, Murray. R. W., *J. Phys. Chem.*, **93** (1989) 5568.
313. Gough. D. A, Leypoldt. J. K., *Anal. Chem.*, **51** (1979) 439.
314. McCarley. R.L, Irene. E.A, Murray. R.W., *J. Phys. Chem.*, **95** (1991) 2492.
315. Leddy. J, Bard. A.J., *J. Electroanal. Chem.*, **153** (1983) 223.
316. Gros. P, Gibson. T, Bergel. A, Comtat. M., *J. Electroanal. Chem.*, **437** (1997) 125.
317. Legrand. J, Dumont. E, Comiti. J, Fayolle. F., *Electrochim. Acta*, **45** (2000) 1791.
318. Dai. Y-Q, Zhou. D-M, Shiu. K-K., *Electrochim. Acta*, **52** (2006) 297.
319. Gueshi. T, Tokuda. K, Matsuda. H., *J. Electroanal. Chem.*, (a) **89** (1978) 247; (b) **101** (1979) 29.
320. Pearce. P. J, Bard. A. J., *J. Electroanal. Chem.*, **112** (1980) 97.
321. Gough. D. A, Leypoldt. J. K., (a) *Anal. Chem.*, **51** (1979) 439; (b) *AIChE. J.*, **26** (1980) 1013; (c) *Anal. Chem.*, **52** (1980) 1126.
322. Reyes De Corcuera. J. I, Cavalieri. R. P, Powers. J. R., *Synthetic Metals.* **142** (2004) 71.
323. Adams. R. N., *Electrochemistry at solid electrodes.* Marcel Dekker, INC. New York and Basel. (1969).
324. Cole. M, Craft. A.W, Parker. L, Bell. S, Seviour. J. A, McGill. A. C, Dole. G., *Clin. Chim. Acta.*, **236** (1995) 19
325. Fujita. K, Maruta. K, Ito. S, Nagatsu. T., *Clin. Chem.*, **29** (1983) 876.

Anexo I: Publicaciones derivadas de esta tesis doctoral

- Yolanda Diñeiro, M. Isabel Menéndez, M. Carmen Blanco-López, M. Jesús Lobo-Castañón, Arturo J. Miranda-Ordieres, Paulino Tuñón-Blanco. "Computational approach to the rational design of molecularly imprinted polymers for voltammetric sensing of homovanillic acid". *Analytical Chemistry*, **77**, 2005, 6741-6746.
- Yolanda Diñeiro, M. Isabel Menéndez, M. Carmen Blanco-López, M. Jesús Lobo-Castañón, Arturo J. Miranda-Ordieres, Paulino Tuñón-Blanco. "Computational predictions and experimental affinity distributions for a homovanillic acid molecularly imprinted polymer". *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 2006, 364-371.

Anal. Chem. 2005, 77, 6741–6746

Computational Approach to the Rational Design of Molecularly Imprinted Polymers for Voltammetric Sensing of Homovanillic Acid

Yolanda Diñeiro, M. Isabel Menéndez, M. Carmen Blanco-López, M. Jesús Lobo-Castañón, Arturo J. Miranda-Ordleres, and Paulino Tuñón-Blanco*

Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, c/Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

A methodology based on density functional theory calculations for the design of molecularly imprinted polymers (MIPs) is described. The method allows the rational choice of the most suitable monomer and polymerization solvent among a set of chemicals traditionally used in MIP formulations for the molecular imprinting of a given template. It is based on the comparison of the stabilization energies of the prepolymerization adducts between the template and different functional monomers. The effect of the polymerization solvent is included using the polarizable continuum model. A voltammetric sensor for homovanillic acid was constructed using different MIPs as recognition element, confirming that the solvent (toluene) and functional monomer (methacrylic acid) selected according to the theoretical predictions lead to the most efficient molecular recognition sensing phase. With the voltammetric sensor prepared using the MIP designed according to the theoretical predictions, a linear response for concentrations of homovanillic acid between 5×10^{-8} and 1×10^{-5} M can be obtained. The limit of detection is 7×10^{-9} M. The selectivity obtained for homovanillic acid over other structurally related compounds buttresses the validity of this strategy of design.

Molecular imprinting is a useful method for the preparation of polymeric porous materials with high selectivity for a molecule (the template) due to memory effects. The basis of molecular memory of molecularly imprinted polymers (MIPs) is the formation of a template–monomer prepolymerization complex, which should maintain during the formation of a highly cross-linked polymeric backbone. The wide variety of functional monomers available makes virtually possible the design of a MIP for any type of molecule.¹ Nevertheless, at the moment, the selection of the best imprinting conditions, such as functional monomer and polymerization solvent, is mainly made in an empirical way.

Some methodological alternatives i.e., combinatorial^{2,3} and computational approaches, have been proposed for the rational

design of MIPs. Combinatorial screening is not a predictive tool, involving in addition a laborious experimental verification. A computational screening based on molecular mechanics (MM) calculations taking into account ~20 monomers against a molecular model of a template has been used as a standard protocol for MIP design.^{4–7} This model predicts the type and quantity of monomers participating in the prepolymerization complex. The use of MM allows fast calculations, but the natural evolution of this proposal is the use of quantum mechanics. Semiempirical methods have been recently used to choose suitable monomers^{8,9} but calculations were made in a vacuum. More reliable results can be obtained using ab initio computational methods. A single report has been published using Hartree–Fock and Møller–Plesset ab initio calculations to design a MIP.³ This study is also restricted to interactions in the gas phase.

The present work is a further step in the ab initio computational path because it takes into account the effect of the polymerization solvent in the design of MIPs. Selecting 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid (homovanillic acid, HVA) as template, we theoretically compared methacrylic acid (MAA) and 4-vinylpyridine (VPY) as functional monomers to test the effect of acid/base groups in the stabilization of the prepolymerization complex. In addition, molecular interactions in five solvents (toluene, chloroform, dichloromethane, acetonitrile, dimethyl sulfoxide (DMSO)) were considered using a method based on a continuous distribution of solvent.¹⁰ The combination of monomer and solvent rendering the most favorable interaction energy is supposed to give the polymer with the highest affinity to the template. This method is, at present, the modeling tool allowing the closest description to a real system.

To assess the validity of the proposed approach, a MIP for the recognition of HVA was designed. This molecule is the major

(3) Dirion, B.; Cobb, Z.; Schillinger, E.; Andersson, L. I.; Sellergren, B. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 15101–15109.

(4) Subrahmanyan, S.; Fletsky, S. A.; Fletska, E. V.; Chen, B.; Karim, K.; Turner, A. P. *F. Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 631–637.

(5) Fletsky, S. A.; Karim, K.; Fletska, E. V.; Day, C. J.; Freebairn, K. W.; Legge, C.; Turner, A. P. *F. Analyst* 2001, 126, 1826–1830.

(6) Chianella, I.; Lotierro, M.; Fletsky, S. A.; Tothill, I. E.; Chen, B.; Karim, K.; Turner, A. P. *F. Anal. Chem.* 2002, 74, 1288–1293.

(7) Fletsky, S. A.; Fletska, E.; Karim, K.; Foster, G.; Legge, C.; Turner, A. *F. Anal. Chem. Acta* 2004, 504, 123–130.

(8) Meng, Z.; Yamazaki, T.; Sode, K. *Biosens. Bioelectron.* 2004, 20, 1068–1075.

(9) Wu, L.; Sun, B.; Li, Y.; Chang, W. *F. Analyst* 2003, 128, 944–949.

(10) (a) Tomasi, J.; Persico, M. *F. Chem. Rev.* 1994, 94, 2027–2094. (b) Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *F. Chem. Rev.* 1999, 99, 2161–2200.

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: +34 985 103487. Fax: +34 985 103125. E-mail: jpb@uniovi.es.

(1) (a) Haupt, K. *F. Anal. Chem.* 2003, 75, 377A–383A. (b) Sellergren, B. *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry*; Elsevier: Amsterdam, 2001. (c) Haupt, K.; Mosbach, K. *F. Chem. Res.* 2000, 100, 2495–2504.

(2) Batra, D.; Shea, K. J. *F. Carr. Opin. Chem. Biol.* 2003, 7, 1–9.

10.1021/ac0513481 CCC: \$30.25 © 2005 American Chemical Society
Published on Web 09/13/2005

Analytical Chemistry, Vol. 77, No. 20, October 15, 2005 6741

metabolite of dopamine, and it was chosen due to its clinical importance as neural crest pediatric tumor marker. Most of the methods used for routine measurement of HVA involved electrochemical detection coupled to a separation technique such as HPLC¹¹ or capillary electrophoresis.¹² However, for mass screening of neuroblastoma, a faster and simpler method is highly desirable. Different immunoassays have been developed¹³ with this aim. Another alternative is to develop a chemical sensor for HVA. A critical step in the development of such a sensor is the design of an effective recognition phase and its coupling to a sensitive transducer. In this work, we describe a voltammetric sensor based on the coupling of the computationally designed MIP for HVA to an electrochemical transducer that allows sensitive and selective determination of HVA.

COMPUTATIONAL METHODS

All calculations have been carried out using Gaussian 98¹⁴ software in a SGI workstation (SGI Origin 3800 platform) running the IRIX 6.5.23f operating system. The computational method developed starts with the use of an ab initio method to locate the most stable template–monomer complexes and the calculation of their electronic stabilization energy relative to isolated fragment, ΔE , through the equation

$$\Delta E = E(\text{template–monomer complex}) - [E(\text{template}) + E(\text{monomer})]$$

Electronic energies were calculated through density functional theory using the hybrid density functional B3LYP. Stable species were located with a full optimization at the B3LYP/6-31G* level (BS I). All of the stable structures were further characterized as minimums on the corresponding potential energy surface, and the zero-point vibrational energies (ZPVEs) were evaluated by analytical computations of harmonic vibrational frequencies at the B3LYP/6-31G* level. To get better interaction energies, additional single-point calculations were performed at the optimized geometries using a larger basis set (B3LYP/6-311+G**) (BS II).

To take into account condensed-phase effects, we used a self-consistent reaction field model proposed for quantum chemical computations on solvated molecules.^{15,16} The solvent is represented by a dielectric continuum characterized by its relative static

dielectric permittivity ϵ_0 . The solute, which is placed in a cavity created in the continuum after spending some cavitation energy, polarizes the continuum, which in turn creates an electric field inside the cavity. Among the different approaches that can be followed to calculate the electrostatic potential created by the polarized continuum in the cavity, we have employed the polarizable continuum model (PCM).¹⁶ Geometries of the isolated reactants and of the most stable 1:1 complexes HVA–MAA and HVA–VPY were fully optimized in toluene (the most adequate solvent as will be seen below) using the Onsager method,¹⁷ but no significant changes were observed on the gas-phase structures. So, energies in solution were evaluated from single-point B3LYP/6-311+G** calculations on the geometries optimized with BS I and used to compare the stability of the template–monomer complexes in solution. This procedure was previously proved to be adequate when association processes take place.¹⁸

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. The molecule used as template, HVA, and its analogues, vanillylmandelic acid (VMA), isovanillic acid (IVMA), and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethanol (MHPE), were purchased from Sigma (Madrid, Spain). The polymerization monomers, MAA, VPY, and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), as well as the initiator, 2,2'-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA), were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All solvents were of HPLC grade and were obtained from Fluka (Madrid, Spain). Other chemicals were of analytical grade.

Apparatus. Electrochemical measurements were performed using a μ -Autolab II electrochemical analyzer (Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands).

All the measurements were made using a conventional three-electrode system using a platinum wire as the auxiliary electrode and a silver/silver chloride/saturated potassium chloride electrode as the reference electrode. A polymer-coated glassy-carbon (GC) electrode acted as the working electrode. GC disk electrodes (3-mm diameter) were obtained from Metrohm.

The sensing phase was synthesized by photochemical polymerization of a thin layer of a mixture of monomers, template, and porogenic solvent spin-coated on the surface of GC electrode. A polymerization chamber was home-designed and constructed (Adepro Ingeniería, Avilés, Spain), allowing operation within the temperature range from –20 to 100 °C, under a controlled flow of nitrogen. The inert gas was previously cooled to the operation temperature (usually 2 ± 0.1 °C) and saturated with the porogenic solvent. The chamber was fitted with a rotator driven by a synchronous motor at a fixed speed of 3000 rpm. The upper wall of the chamber was a glass window and the UV lamp (Vilber-Lourmat VL-115BL), with an output of 15 W and an emission peak at 360 nm, was placed 5 cm above.

Preparation of Polymer-Coated Electrodes. GC disk electrodes were polished successively with 1- and 0.3- μ m alumina slurries (Buehler) on a metallographic polishing cloth. Then the

(11) Yao, J. K.; Cheng, P. J. *Chromatogr., B* 2004, 810, 93–100.

(12) Li, X.; Jin, W.; Wen, Q. *Anal. Chim. Acta* 2002, 461, 123–130.

(13) (a) Shi, R. Z.; Ho, Y. P.; Yeung, J. H. K.; Or, P. M. Y.; To, K. K. W.; Lau, M. W. M.; Arumamayagam, M. *Clin. Chem.* 1998, 44, 1674–1679. (b) Taran, F.; Frobort, Y.; Crémillon, C.; Grassi, J.; Olíchón, D.; Miśkowskí, C.; Pradelles, P. *Clin. Chem.* 1997, 43, 363–368.

(14) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorski, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian, Inc.*: Pittsburgh, PA, 1998.

(15) Rival, J. L.; Rinaldi, D.; Ruiz-López, M. F. In *Theoretical and Computational Models for Organic Chemistry*; Formosinho, S. J., Csizmadia, I. G., Arnaut, L., Eds.; NATO ASI Series C; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1991; p 339.

(16) (a) Miertus, S.; Scrocco, G.; Tomasi, J. *Chem. Phys.* 1981, 55, 117–129.

(b) Miertus, S.; Tomasi, J. *Chem. Phys.* 1982, 65, 239–245. (c) Cossi, M.;

Barone, V.; Cammi, R.; Tomasi, J. *Chem. Phys. Lett.* 1996, 255, 327–335.

(17) Onsager, L. *J. Am. Chem. Soc.* 1936, 58, 1486–1493.

(18) (a) Singleton, D. A.; Wang, Y.; Yang, H. W.; Romo, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2002, 41, 1572–1575. (b) Pelotier, B.; Rajmanna, M.; Pons, J. M.; Campomanes, P.; López, R.; Sordo, T. L. *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 2699–2606

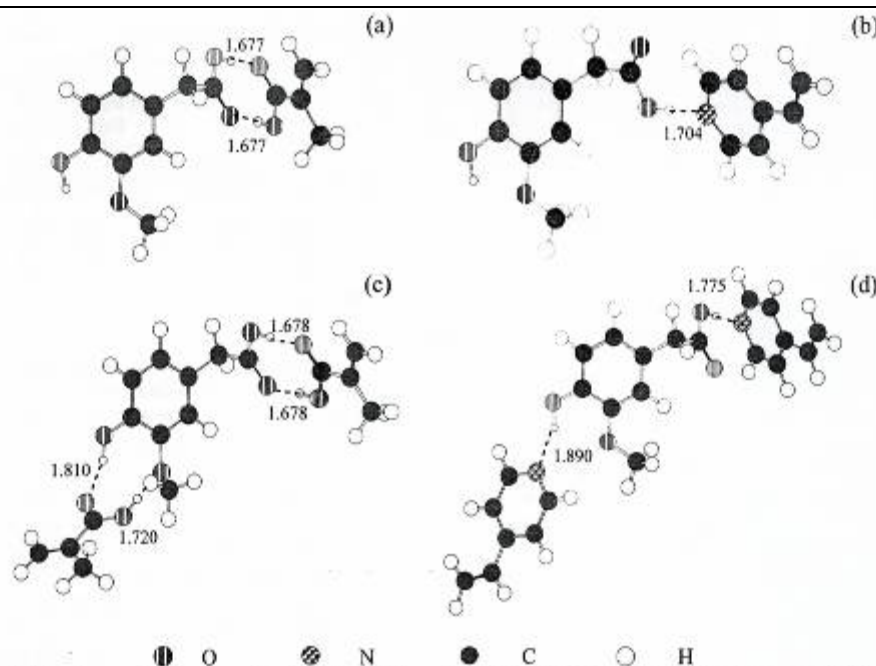


Figure 1. Optimized geometries for the most stable 1:1 and 1:2 complexes between HVA and the functional monomers: (a) HVA-MAA, (b) HVA-VPY, (c) HVA-(MAA)₂, and (d) HVA-(VPY)₂. Distances in angstroms.

electrodes were washed with Milli-Q water for 5 min in an ultrasonic bath and subjected to a differential pulse voltammetric scan between 0 and +1.2 V in a 0.1 M citrate/HCl solution, pH 1.1. The process was repeated until a stable voltammogram was obtained and then used for the preparation of the modified electrode.

The prepolymerization mixture was prepared by dissolving HVA (0.12 mmol), MAA (0.72 mmol), and EGDMA (2.88 mmol) in 0.250 mL of the selected solvent. Toluene and DMSO were the solvents experimentally tested. The solution was introduced in an ice bath and was purged by bubbling helium gas into the mixture for 1 min before and after the addition of 23.6 mg of the photoinitiator, DMPA.

For the preparation of the imprinted polymer-modified electrode (MIPE), the GC electrode was inserted in the polymerization chamber under flow of nitrogen gas at 2 °C. A 10- μ L aliquot of the prepolymerization mixture was placed onto the electrode surface, and the UV lamp was turned on. After 1 min of polymerization, a 5-s, 3000 rpm spin cycle was started. Then, the nitrogen flow was stopped, and the irradiation was continued for 30 min. A control electrode coated with a nonimprinted polymer (NIPE) was prepared following the same procedure but without the template molecule in the prepolymerization mixture.

Voltammetric Measurement. The polymer-modified electrodes were used in differential pulse voltammetric (DPV) measurements (50 mV of pulse amplitude and 50 ms of pulse width) with an aqueous 0.1 M sodium citrate/HCl solution, pH 1.1, containing 40% of acetonitrile to ensure the wettability of the polymer layer as electrolyte solution, according to the following protocol:

1. Washing step: removal of the template by washing with a 9 + 1 (v/v) dioxane/methanol mixture until a stable background voltammogram was obtained.

2. Binding step: the polymer-modified electrode was immersed in a solution of HVA in the porogenic solvent for a selected time (typically 15 min). Subsequently it was immersed in acetonitrile for 5 s before being transferred to the electrochemical cell in order to remove the weakly adsorbed HVA molecules.

3. Quantification step: a DPV voltammogram was obtained in the electrolyte solution. The peak current obtained under these conditions is related to the concentration of HVA in the binding solution.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Design of the Molecular Recognition Element. Theoretical Predictions. Geometries of isolated reactants, HVA, MAA, and VPY, were initially optimized, finding that the most stable isomer of HVA shows an intramolecular hydrogen bond between the hydroxyl and methoxy groups. Cartesian coordinates of isolated molecules can be seen in Table S1 in Supporting Information.

Figure 1a and b displays the most stable prepolymerization complexes located between HVA and MAA or HVA and VPY; their Cartesian coordinates are also summarized in Table S1. Other less stable complexes were also located and their geometries are collected in Figure S1. To test the stabilization produced by a second monomer molecule saturating the remaining groups on HVA, 1:2 complexes were also studied (Figure 1c and d). Table S2 in Supporting Information shows absolute electronic energies of all of the complexes located. Table 1 shows the electronic stabilization energies in the gas phase, including ZPVE correction

Table 1. B3LYP/6-311+G/B3LYP/6-31G* Electronic Stabilization Energies, Including ZPVE Correction from 6-31G* Calculations, and Interaction Energies in Solution of the Most Stable Prepolymerization Complexes (All in kcal/mol)**

	$\Delta(E + \text{ZPVE})$	ΔE_{soln}				
		toluene	CHCl ₃	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ CN	DMSO
HVA-MAA	-14.9	-12.5	-10.9	-9.8	-10.2	-9.5
HVA-VPY	-10.0	-8.0	-6.6	-5.6	-6.4	-5.5
HVA-(MAA) ₂	-21.9	-15.2	-14.3	-12.0	-13.3	-11.3
HVA-(VPY) ₂	-14.6	-10.6	-9.6	-8.1	-9.9	-8.0

and stabilization energy in solution for the most stable HVA-MAA and HVA-VPY prepolymerization complexes.

The most striking observation is that, contrary to the usually applied criteria, an acidic functional monomer, MAA, was found to be the best for the imprinting of an acidic template molecule both in electronic energy and in all the checked solvents. Toluene is the most favorable solvent, followed by chloroform, acetonitrile, dichloromethane, and DMSO. Complexes with two molecules of monomer are the most stable, and Figure 1 shows that the recognizing cavity in the MIP should place two functional groups in opposite extremes. Exploring the possibility of an acid/base interaction between HVA and VPY, efforts to locate HVA-VPY complexes in which a proton had been transferred to the base were unsuccessful. Hydrogen bonding is the predominant interaction for both monomers. Unspecific interactions between HVA and the cross-linker were also evaluated, and it was found that electrostatics energy of the most stable HVA-EGDMA complex in toluene was -4.9 kcal/mol. Therefore, HVA interacts more favorably with the functional monomer than with the cross-linker.

Voltammetric Sensor for HVA. The electrochemical characteristics of HVA at GC electrodes were investigated. Cyclic voltammetry studies in pH 1.1 solutions shows the typical behavior of an electroactive species that suffers an initial oxidation process followed by a fast chemical reaction. This behavior is identical to that previously described for the oxidation of other substituted methoxyphenols at carbon paste electrodes.¹⁹ On the first anodic scan, an irreversible oxidation process is observed with a peak potential of 0.81 V (pH 1). In the reverse scan, a reduction process that forms a quasi-reversible system with a second oxidation process, first observed in the second scan, is obtained. This system, ascribed to the oxidation/reduction process of the quinone obtained after a fast chemical reaction between the oxidation product of HVA and water, has a formal potential of 0.50 V (pH 1).

The main oxidation peak at 0.81 V could be used as an analytical signal in the development of a method for HVA determination. This process is diffusion-controlled, and in DPV at pH 1, its peak current is linearly related to HVA concentration in the range 5×10^{-7} – 2×10^{-4} M with a detection limit of 3×10^{-7} M. The selectivity of the electrochemical detection is limited. Although compounds with oxidation peak potentials much greater than +0.8 V will not give a significant response, other compounds more easily oxidized will interfere. An additional degree of

(19) (a) Petek, M.; Bruckenstein, S.; Feinberg, B.; Adams, R. N. *J. Electroanal. Chem.* 1973, 42, 397–401. (b) Stenson, A. W.; McCreery, R.; Feinberg, B.; Adams, R. N. *J. Electroanal. Chem.* 1973, 46, 313–321.

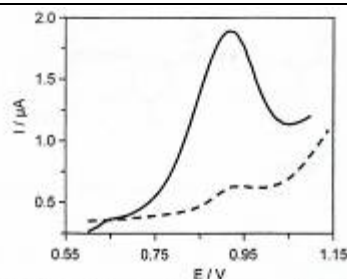


Figure 2. Differential pulse voltammograms obtained with electrodes coated with MIP (solid line) and NIP (dashed line), prepared using MAA and toluene, after an incubation step in a solution of 5×10^{-5} M HVA in toluene. Background electrolyte: 0.1 M citrate/HCl, pH 1.1 with 40% acetonitrile.

selectivity could be attained modifying the electrode surface with a selective receptor of HVA such as a MIP, which could also improve the sensitivity of the detection.

We designed a voltammetric sensor for HVA that incorporates a MIP as recognition element. The sensing phase was prepared by following the procedure summarized in the Experimental Section using either MAA or VPY as functional monomer in order to experimentally verify DFT calculations. The selected polymerization solvent was toluene or DMSO, which are respectively the best and worst porogenic solvents according to the theoretical predictions. The low solubility of VPY in toluene precludes the preparation of a MIP or NIP using both VPY and toluene. The electrodes modified with MIP and NIP were incubated for 15 min in a 5×10^{-5} M HVA solution in the same solvent that was used in the prepolymerization mixture. During this step, HVA was incorporated into the polymer layer. Then, the modified electrode was employed in DPV measurements in a 0.1 M citrate/HCl solution, pH 1.1, with 40% acetonitrile. This measurement solution was selected because, according to the theoretical results, in electronic energy terms MAA forms more stable complexes with citric acid (-20.7 kcal/mol) than with HVA (-14.9 kcal/mol). Therefore, citric acid could release HVA from its complexes with the monomer. This was experimentally confirmed using for the voltammetric measurements HCl/KCl 0.1 M pH 1.1 with 40% acetonitrile. In the last case, the peak currents for HVA were almost half of those obtained in 0.1 M citrate/HCl, indicating that citric acid significantly contributes to the release of HVA from the recognition sites of the polymer. This way, the released HVA diffuses from the recognition sites of the polymer layer to the electrode surface where it is detected. In the cases where HVA is accumulated in the polymer layer, an oxidation process, similar to that obtained at bare GC electrodes, with a peak potential of ~0.9 V is observed with the modified electrodes (Figure 2). When using MAA and toluene in the polymerization step, the peak current measured with MIPE was ~10 times greater than that corresponding to NIPE under the same operating conditions (Table 2). On the contrary, when DMSO was used as both polymerization and incubation solvent, the amount of HVA detected after the incubation step was lower and indistinguishable, within the experimental error, at MIPE and NIPE. Using VPY as functional monomer and DMSO as porogenic solvent, a polymer layer with even less affinity for HVA was obtained. Thus, the

Table 2. DPV Peak Currents Obtained for [HVA] = 5×10^{-5} M at MIPE and NIPE Prepared from Different Functional Monomer and Porogenic Solvent

porogenic solvent/ functional monomer	<i>I</i> (μA)	
	toluene	DMSO
MIPE/MAA	1.05	0.51
NIPE/MAA	0.10	0.59
MIPE/VPY		0.18
NIPE/VPY		nd ^a

^a nd, not detected.

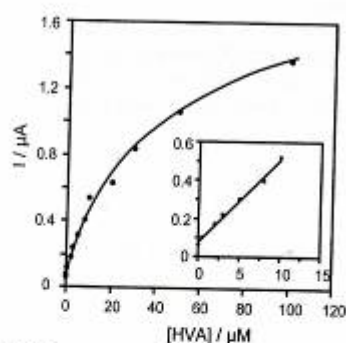


Figure 3. DPV responses obtained in a pH 1.1, 0.1 M citrate/HCl solution (40% acetonitrile) with a MIPE previously incubated for 15 min in toluene containing increasing amounts of HVA. The inset shows the linear region of the response curve.

recognition element with the highest affinity for HVA is obtained using MAA as functional monomer and toluene as porogenic solvent, according to computational predictions. These were the functional monomer and solvent selected for further experiments.

The incorporation of HVA to the MIP-polymer layer was employed as an effective preconcentration system in the development of a voltammetric sensor for the determination of this dopamine metabolite. The rebinding of the template was investigated in a 5×10^{-5} M HVA solution in toluene, changing the incubation time from 0.5 to 30 min. The amount of bound HVA was estimated by measuring the peak current of the voltammogram registered in the quantification step. A linear increase of the peak current of HVA with the time of the incubation step was obtained up to 5 min, and the equilibrium of the binding step was obtained above 15 min. No preconcentration was obtained with unmodified glassy carbon electrodes. The peak current after 15-min incubation in a toluene solution containing 5×10^{-5} M HVA was 20 times that obtained with a NIP-modified electrode. Figure 3 shows the curve response obtained with MIPE after incubation for 15 min in toluene with increasing amount of HVA. A linear response between 5×10^{-6} and 1×10^{-5} M was obtained ($I/A = (0.044 \pm 0.002) [HVA]/M + (7.0 \pm 0.9) \times 10^{-3}$; $n = 9$; $r = 0.995$), with a detection limit of 7×10^{-6} M. At higher concentration, deviation from linearity was obtained. When the concentration of HVA is plotted in a logarithmic scale, the response curve is exponential, resembling those obtained using natural antibodies as recognition elements.

The reproducibility and reversibility of the sensor were studied by repeating the washing-incubation-measurement cycle with

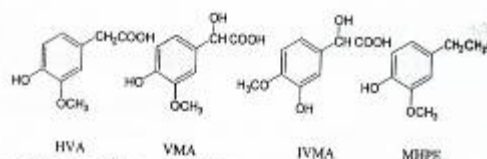


Figure 4. Structure of HVA and other structurally related compounds.

Table 3. B3LYP/6-311+G//B3LYP/6-31G* Electronic Stabilization Energies, Including ZPVE Correction from 6-31G* Calculations and Interaction Energies in Solution of the Complexes between MAA and HVA, and Other Chemically Related Compounds (All in kcal/mol)**

	$\Delta(E + ZPVE)$	$\Delta E_{\text{toluene}}$
HVA-MAA	-14.9	-12.5
VMA-MAA	-15.5	-13.0
IVMA-MAA	-15.2	-13.2
MHPE-MAA	-2.9	-0.9

Table 4. DPV Peak Currents for [HVA] = 5×10^{-5} M at MIPE and NIPE

	<i>I</i> (μA)			
	HVA	VMA	IVMA	MHPE
MIPE	0.320	1.200	0.779	0.145
NIPE	0.016	0.092	0.162	0.172
MIPE/NIPE	20	13	5	0.84

the same sensor. For a 5×10^{-4} M HVA solution, a mean peak current value of $0.34 \mu\text{A}$ and a relative standard deviation of 3.6% were obtained.

Cross-Reactivity of the MIP. Cross-interactions between MIP and the structural analogues of HVA, VMA, IVMA, and MHPE (Figure 4) were also analyzed both theoretically and experimentally.

Electronic stabilization energies, including ZPVE correction, and stabilization energy in solution of the 1:1 complexes of each analogue and MAA are shown in Table 3. From these results, VMA and IVMA lead to complexes of a stability similar to that of HVA, whereas MHPE gives rise to complexes with MAA of low stability. Therefore, the substitution of the carboxylic group of HVA by a hydroxyl group should drastically modify the affinity of the recognition sites by the resulting molecule.

To confirm these results, the voltammetric sensor for HVA previously described was incubated in solutions of HVA-related compounds in toluene. From the voltammetric data summarized in Table 4, it is clear that MHPE shows the lowest affinity for MIPE and the highest for NIPE. On the contrary, the sensing phase binds VMA and IVMA more strongly than HVA, although NIPE gives also signals for VMA and IVMA that are ~ 10 times that obtained for HVA. This could be caused by the aliphatic hydroxyl groups of VMA and IVMA, which reinforce unspecific hydrogen bonding and probably difficult accommodation in the cavity of specific recognition sites. It is worth noting that the ratio between the response of MIPE and NIPE is always more favorable for HVA.

CONCLUSIONS

The comparison of DFT stabilization energies of the prepolymerization complexes between a selected template and different acrylic compounds among those traditionally used in the formulation of MIPs allows the rational choice of the most favorable monomer for the preparation of an acrylic MIP selective to the template. The effect of the polymerization solvent, described using the PCM, is shown to be of paramount importance for the enhancement of the selectivity and sensitivity of the polymer. This general strategy for the design of MIP has been shown to be successful for the development of a MIP-based sensing phase for homovanillic acid, with MAA the monomer showing higher affinity and toluene the best porogenic solvent. We have described the performance of a voltammetric sensor based on the coupling of the recognition phase to a glassy carbon electrode. The sensor

exhibited very good analytical characteristics in terms of sensitivity, reproducibility, and selectivity.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the Spanish Government (MCYT, Project BQU2002-00261). Y.D. thanks the Spanish MCYT for a FPU grant.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review July 28, 2005. Accepted August, 8, 2005.

AC0513461



Computational predictions and experimental affinity distributions for a homovanillic acid molecularly imprinted polymer

Yolanda Diñeiro, M. Isabel Menéndez, M. Carmen Blanco-López, M. Jesús Lobo-Castañón, Arturo J. Miranda-Ordieres, Paulino Tuñón-Blanco*

Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo, Julián Clavería, 8. 33006 Oviedo, Spain

Received 23 September 2005; received in revised form 20 February 2006; accepted 2 March 2006

Available online 12 June 2006

Abstract

Density Functional Theory calculations have been used to select, among a set of chemicals traditionally used in the formulation of non-covalent molecularly imprinted polymers (MIPs), the best functional monomer and porogenic solvent for the construction of a recognition element for the dopamine metabolite homovanillic acid (HVA). Theoretical predictions were confirmed through batch binding assays and voltammetric detection. The computational method predicts that trifluoromethacrylic acid and toluene are the monomer and solvent rendering the highest stabilization energy for the pre-polymerization adducts. HVA–MIP prepared using this formulation gives rise to a binding isotherm that is accurately modelled by the Freundlich isotherm. The binding properties of this polymer were estimated using affinity distribution analysis. An apparent number of sites of $13 \mu\text{mol g}^{-1}$ with an average affinity constant of $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ was obtained in the concentration window studied. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Molecularly imprinted polymers; Computational design; Homovanillic acid; Binding isotherms

1. Introduction

The development of synthetic receptors capable of recognizing different biomolecules and mimicking natural receptors is an important area in Chemistry today. Between the different approaches adopted so far, molecular imprinting technology has been intensely studied (Sellergren, 2001; Haupt, 2003; Wulff, 2002). Molecularly imprinted polymers (MIPs) have remarkable recognition properties of great interest in a range of applications from an analytical point of view, i.e. chromatographic separations (Remcho and Tan, 1999; Takeuchi and Haginaka, 1999; Spiegel et al., 2003), solid phase extraction (Stevenson, 1999; Mahony et al., 2005), binding assays (Vlatakis et al., 1993), chemical sensors (Blanco-López et al., 2003, 2004; Diaz-García and Badía, 2004) and in synthetic chemist (Alexander et al., 2003).

Although the synthesis of non-covalent MIPs is relatively easy and a large library of functional monomers is available, optimization of MIP formulation implies the selection of the

best functional monomer and the most adequate polymerization solvent for each selected template, among other reagents. In practice, standard formulations using chemical intuition are usually employed and attempts aiming at modifying the properties of the polymers are mainly based on the trial-and-error method. To facilitate the selection of the imprinting conditions, combinatorial screening approaches and molecular mechanics calculations (Lanza and Sellergren, 1999; Takeuchi et al., 1999; Piletsky et al., 2001; Subrahmanyam et al., 2001; Chianella et al., 2002) or semi-empirical quantum methods (Wu et al., 2003; Meng et al., 2004) have been described. These approaches allow the identification of the best functional monomer for imprinting.

Recently, we have developed a general strategy for the rational design of MIPs (Diñeiro et al., 2005) that permits the selection of the functional monomer and polymerization solvent. It is based on Density Functional Theory calculations of the stabilization energies of the prepolymerization adduct between a selected template and different functional monomers. The effect of the polymerization solvent is included using the polarizable continuum model. Homovanillic acid was selected as template for this investigation due to its structure with several functional groups and its clinical importance as a neural

* Corresponding author. Tel.: +34 985103487; fax: +34 985103125.
E-mail address: peb@uniovi.es (P. Tuñón-Blanco).

crest pediatric tumor marker. In this work, we have extended the number of functional monomers theoretically evaluated, including 2-trifluoromethacrylic acid and 2-methyl-methacrylamide, and we provide experimental evidence for binding by measuring the affinity to HVA and other chemically related compounds of the polymer prepared using the formulation that theory predicts. Adsorption equilibrium isotherms of HVA on the MIP were obtained by monitoring a voltammetric signal that is proportional to the concentration of the unbound template. The binding characteristics of the polymer were studied using three different adsorption isotherm models frequently used in the characterization of this kind of polymers: the Langmuir discrete model and the continuous distribution models, Freundlich and Langmuir–Freundlich (Umpleby et al., 2000, 2001a,b, 2004; Rampey et al., 2004; Rushton et al., 2005). The model that provides the best fit for the experimental data is selected to obtain the distribution function of the polymer by means of the affinity spectrum method (AS), which is the simplest and most popular numerical algorithm for the determination of the binding site heterogeneity of MIPs (Umpleby et al., 2000; Szabelski et al., 2002; Thakur et al., 1980).

2. Computational methods

All calculations have been carried out using Gaussian 98 (Frisch et al., 1998) software in a SGI workstation (SGI Origin 3800 platform) with the IRIX 6.5.23f operating system. Electronic energies were calculated through Density Functional Theory (DFT) using the hybrid density functional B3LYP. Geometry optimizations were performed at the B3LYP/6-31G* level. To obtain better interaction energies, additional single point calculations were performed at the optimized geometries using a larger basis set (B3LYP/6-311+G** level). The methodology used was previously described (Diñeiro et al., 2005). Briefly, for each selected functional monomer the most stable template–monomer complexes are located and their electronic stabilization energy relative to isolated fragments, ΔE , are calculated through the equation:

$$\Delta E = E(\text{template-monomer}) - [E(\text{template}) + E(\text{monomer})] \quad (1)$$

Finally, stabilization energies in different solvents are calculated using the United Atom Hartree–Fock (UAHF) Polarizable Continuum Model (PCM) (Cossi et al., 1996) in order to select the most stabilizing one.

3. Experimental

3.1. Chemicals

Homovanillic acid (HVA), vanillylmandelic acid (VMA), isovanillic acid (IVMA), 4-hydroxy-3-methoxyphenylethanol (MHPE), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), 2-trifluoromethacrylic acid (TFMAA), methacrylic acid (MAA), 2-methyl-methacrylamide (MA), 2,2'-azo-bis-(isobutyronitrile) (AIBN) and 2,2'-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA)

were purchased from Sigma (Spain) and used as received. All chemicals were of analytical grade, and solvents were of HPLC quality (Fluka, Spain).

The carbon paste was prepared by thoroughly mixing in a mortar 5 g of graphite powder (Dicoex, Bilbao, Spain) and 1.8 mL of paraffin oil (Merck, Spain).

3.2. Instrumentation

Differential pulse voltammetry (DPV) was performed using a μ -Autolab electrochemical analyzer (Eco Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands) with GPES 4.8 software. All the measurements were made using a conventional three-electrode system. A platinum wire served as counter electrode and a Ag|AgCl|KCl(sat.) acted as reference. The working electrode was a 3-mm diameter carbon paste electrode.

3.3. Procedures

To verify the results of the computational method for MIP design we have adapted a procedure for small-scale preparation of polymers (Lanza and Sellergren, 1999). A solution containing 4.24 mmol of EGDMA, 140 μ mol of HVA, 120 μ mol of initiator (AIBN or DMPA) and 1.8 mL of polymerization solvent (toluene or dichloromethane) was prepared. An aliquot of 650 μ L of this solution was mixed with 210 μ mol of functional monomer (TFMAA, MA or MAA). Sixty five microlitre of the resulting polymerization mixture were dispensed into 2-mL glass vial. Each vial was then sealed with a rubber septum and purged with He for 5 min. The vials were placed in an oven at 60 °C during 2 h for thermal polymerization or in a thermostatic chamber at 2.1 °C and under UV light for 2 h for photopolymerization.

For the preparation of the normal-scale polymers, EGDMA (4 mL; 21.2 mmol), TFMAA (0.58825 g; 4.2 mmol), and the template molecule (0.1275 g; 700 μ mol) were mixed with 7 mL of toluene or acetonitrile. DMPA (0.1535 g; 600 μ mol) was used to initiate photopolymerization. The pre-polymerization mixture was degassed with He for 1 min in an ice bath before and after addition of the photoinitiator. Photopolymerization was carried out in a thermostatic chamber (2.1 °C) under nitrogen atmosphere and UV light (365 nm). The polymers were crushed and sieved in order to select particles with a diameter below 50 μ m.

Control polymers (NIP) were in all cases prepared in the same way but without template.

The template was removed from MIPs by washing with a mixture of 10% (v/v) acetic acid and 90% (v/v) methanol, until HVA was not detected by DPV. Finally, the polymers were washed with the solvent used in the subsequent batch rebinding experiments in order to verify that no template bleeding occurred.

3.4. Batch rebinding experiments

Stocks solutions of HVA in the same solvent as that used as porogen in the MIP formulation were prepared and diluted in order to obtain solutions with HVA concentration in the range 1.4×10^{-6} to 1.2×10^{-3} M. Aliquots of these solutions were incubated with mini-MIPs or with a fixed amount of MIP or NIP

of 10 mg mL⁻¹ for 24 h in a tilting mixer. In order to determine the amount of free HVA in the supernatant, 1 mL of the solution was separated and the organic solvent evaporated. The residue was dissolved in citrate/HCl 0.1 M pH 1.1 and the amount of HVA in the solution was determined by DPV, using 50 mV of pulse amplitude and 50 ms of pulse width. The concentration of HVA bound to polymer (B) is obtained as the difference between the total concentration of HVA used in the assay (T), and the concentration of free HVA measured after equilibrium (F).

The experimental binding data were fitted to the discrete Langmuir and the continuous Freundlich and Langmuir–Freundlich models.

3.4.1. Langmuir isotherm (LI)

The Langmuir isotherm (Eq. (2)) is a discrete model that involves only one type of binding site:

$$B = \frac{N_t K_0 F}{1 + K_0 F} \quad (2)$$

where N_t is the total number of binding site and K_0 is the average affinity.

From the Scatchard plot (B/F versus B format), we can easily extract the binding parameters: K_0 and N_t . Systems which fit to the Langmuir isotherm, lead to a straight line in the Scatchard plot with a slope equal to $-K_0$ and an x -intercept equal to N_t .

3.4.2. Freundlich isotherm (FI)

It is the most easily applied continuous distribution model. The FI is a power function (Eq. (3)), where the pre-exponential factor a is a measure of the capacity (N_t) and average affinity (K_0) and m is the heterogeneity index:

$$B = aF^m \quad (3)$$

The heterogeneity increases as the value of m decreases. This model is applied by plotting the experimental binding isotherm in $\log B$ versus $\log F$ format. In this format, systems that fit to the FI fall on straight line, having a slope of m and a y -intercept of $\log a$.

3.4.3. Langmuir–Freundlich isotherm (LFI)

The LFI (Eq. (4)) is a hybrid model of Langmuir and Freundlich isotherms which describes a specific relationship between the equilibrium concentration of bound and free guest with three fitting coefficients: N_t , a and m . N_t is the total number of binding sites, a is related to the average binding affinity (K_0) towards $K_0 = a^{1/m}$, and m is the heterogeneity index.

$$B = \frac{N_t a F^m}{1 + a F^m} \quad (4)$$

The experimental adsorption isotherm was fit to the LFI, FI and LI models using a log plot ($\log B$ versus $\log F$). This was accomplished using the solver function in Microsoft Excel 2000, using a method recently described (Rampey et al., 2004). For each model, the corresponding fitting parameters were varied to maximize the coefficient of determination (R^2). The corresponding residuals, used to obtain the coefficient of determination,

were calculated as $\log B_{\text{exp}} - \log B_{\text{calc}}$. The standard errors in the fitting coefficients were calculated using the Lab Fit Curve fitting software (v 7.2.33). The affinity distribution spectrum was obtained using the Hunston's numerical approximation method (Thakur et al., 1980) by means of an analytical solution of the Hunston equation for the specific case of the Freundlich isotherm (Rampey et al., 2004).

4. Results and discussion

4.1. Theoretical selection of the functional monomer and porogenic solvent

The formation of a complex between the template and the functional monomer in the porogenic solvent is the first step in the imprinting process. In this work, two functional monomers, TFMAA and MA were theoretically analysed as possible functional monomers for the imprinting of HVA. The structure of the most stable complexes between HVA–TFMAA and HVA–MA is presented in Fig. 1. Calculations indicate that hydrogen bonding is the main stabilising interaction and that, for 1:2 complexes, both monomer molecules are placed in opposite extremes of the template, oriented by its functional groups.

The electronic stabilization energy, including ZPVE corrections, of each complex in the gas-phase are collected in Table 1. To show a more complete view, we also include the stabilisation energies of HVA–MAA pre-polymerization complexes recently published (Diñeiro et al., 2005). Although VPY was also considered in the previous paper, it is now discarded as functional monomer due to its small interaction with HVA. In electronic energy the highest stabilization is obtained for the 1:2 complexes, following the sequence: HVA–(TFMAA)₂ > HVA–(MAA)₂ > HVA–(MA)₂. The presence of the solvents considered (toluene, chloroform, dichloromethane, and acetonitrile) influences the binding between monomer and template, but the stability order is maintained. As it is shown in Table 1, toluene is the most favourable solvent, followed by chloroform, acetonitrile and dichloromethane and TFMAA is the functional monomer that leads to the most stable pre-polymerization complex in all the tested solvents.

To predict the selectivity of the TFMAA-polymer, the association of the functional monomer and the structural analogous of HVA shown in Fig. 2 was theoretically studied. Table 2 sum-

Table 1
Electronic stabilization energies, including ZPVE corrections, and interaction energies in solution for the most stable pre-polymerization complexes located between the template and the tested functional monomers

	$\Delta(E + \text{ZPVE})$	$\Delta E_{\text{solution}}$			
		Toluene	CHCl ₃	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ CN
HVA–TFMAA	-19.8	-17.1	-15.4	-14.2	-14.7
HVA–(TFMAA) ₂	-31.5	-25.7	-23.7	-21.4	-22.7
HVA–MA	-13.6	-11.7	-10.4	-6.2	-9.8
HVA–(MA) ₂	-19.6	-14.9	-13.1	-11.2	-12.8
HVA–MAA	-14.9	-12.5	-10.9	-9.8	-10.2
HVA–(MAA) ₂	-21.9	-16.5	-14.3	-12.0	-13.2

All in kcal/mol.

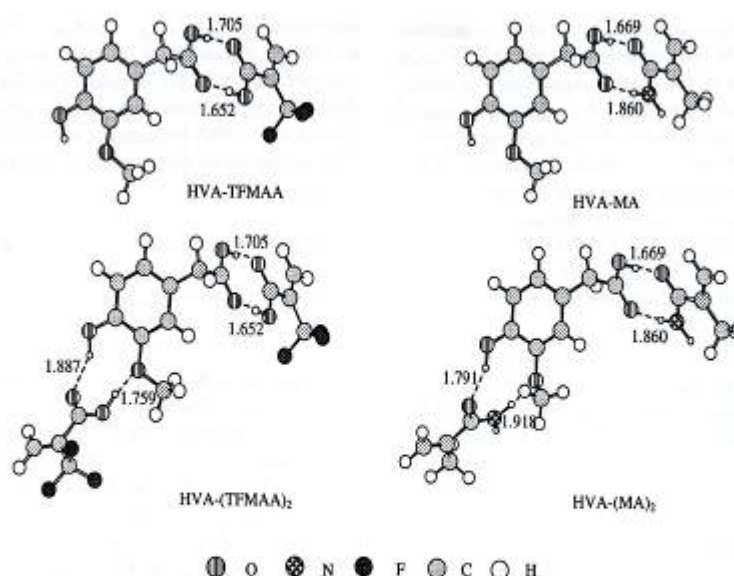


Fig. 1. Optimized geometries for the most stable adducts located between HVA and MA or TFMAA. Distances in Angstroms.

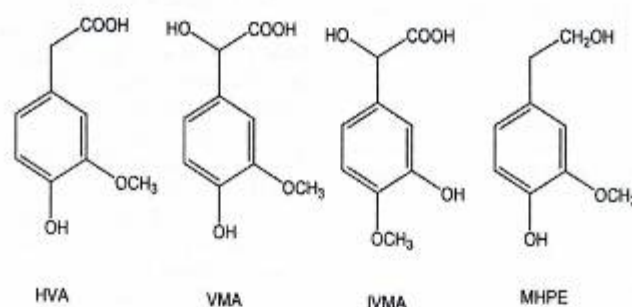


Fig. 2. Structure of HVA and some structural analogues.

marizes the electronic stabilization energies, including ZPVE corrections, and stabilization energy of the 1:1 and 1:2 complexes between TFMAA and each analogous. VMA and IVMA lead to complexes with TFMAA of similar stability to that of HVA, both more stable than that obtained with MAA. MHPE, that has a hydroxyl group instead the carboxylic group present in

the rest of molecules, forms with TFMAA the complex with the lowest stability. This is typical for the strong hydrogen bond formation that can be expected between carboxylic acids in poorly polar aprotic solvents. Assuming that the structure of the complexes existing in solution reflects the structure of the subsequently formed binding sites, this fact may indicate that the formation of the double hydrogen bond between the acidic groups of the functional monomer and the template is the key interaction that dominates the binding.

Table 2

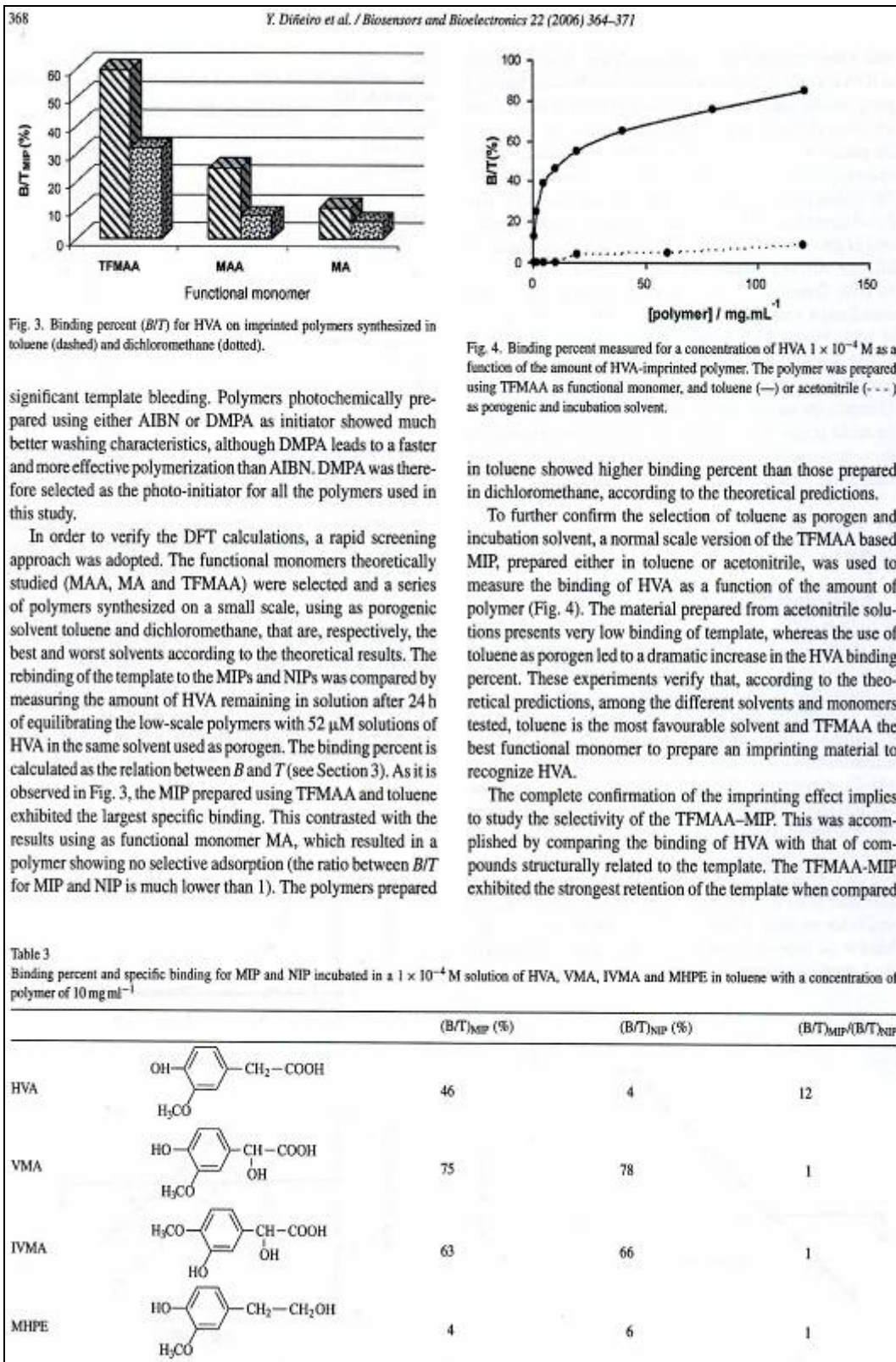
Electronic stabilization energies, including ZPVE corrections, and interaction energies in solution of the complexes between TFMAA and some structural analogues of HVA

	$\Delta(E + \text{ZPVE})$	$\Delta E_{\text{toluene}}$
VMA-TFMAA	-20.1	-17.1
VMA-(TFMAA) ₂	-32.0	-31.7
IVMA-TFMAA	-20.1	-17.3
IVMA-(TFMAA) ₂	-32.4	-31.4
MHPE-TFMAA	-13.7	-7.0
MHPE-(TFMAA) ₂	-25.7	-14.9

All in kcal/mol.

4.2. Experimental confirmation of the imprinting effect

Much of the molecularly imprinted polymers described in the literature have been prepared by thermal polymerization using AIBN as initiator. Alternatively, photochemical polymerization can be employed. These two polymerization methods were employed in our preliminary experiments. It was found that polymers thermally prepared using AIBN had the lowest kinetic of template releasing, leading to slow washing steps and



with a non-imprinted control polymer (Table 3). VMA, which as HVA is a carboxylic acid and contains an additional hydroxyl group, exhibit higher binding percent than HVA in the MIP, but the nature of the binding is unspecific because the same binding percent is obtained in the NIP. In IVMA the position of the hydroxyl and methoxy groups is swapped with respect to VMA. The binding percent in the MIP and the NIP is slightly lower than that obtained for VMA, but again, the specific binding, evaluated as the relation between the binding percent measured for MIP and NIP, is 12 times lower than the corresponding value for HVA. Therefore, the hydroxyl and methoxy groups in positions 3 and 4, contribute only in a low extent to the recognition of HVA. Finally, MHPE displays low retention percent both in MIP and NIP. This may be due to the different structure of this molecule, which has a hydroxyl group instead of carboxyl. Therefore, the formation of the double hydrogen bond between the acidic groups of the template and the functional monomer is the main interaction responsible of the recognition in the binding sites. These evidences confirm the theoretical results.

4.3. Characterization of the binding properties of TFMAA polymers

Non-covalent MIPs are characterized by a heterogeneous distribution of binding sites with different affinity and selectivity. The characterization of these polymers supposes to determine the number of binding sites having a determined binding affinity, particularly in the range of template concentrations useful from an analytical point of view. This question was answered by performing batch rebinding experiments with MIP. Different amount of HVA in the range 1.4×10^{-6} M to 1.2×10^{-3} M were added to a suspension of 10 mg mL^{-1} of the polymers in toluene. The adsorption isotherm was obtained by plotting the concentration of bound versus unbound species (Fig. 5). Values of free template in the range 2.7×10^{-7} to 5.1×10^{-4} M were obtained and the saturation was not reached. The binding isotherm has been fitted to the three models summarized in Section 2, and the results are reported in Table 4. In the measured concentration window the imprinted polymer can be accurately modelled by the Freundlich isotherm.

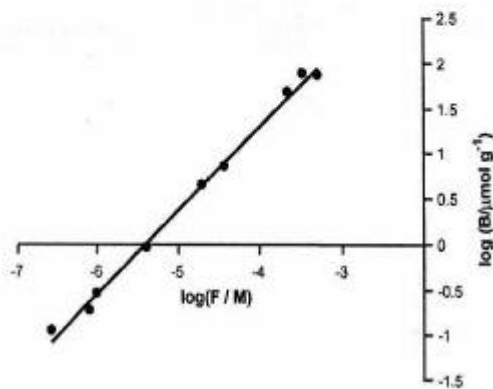


Fig. 5. Binding isotherm for the HVA-MIP.

Table 4
Fitting coefficients for the Langmuir, Langmuir–Freundlich, and Freundlich models of the MIP

Langmuir (LI)	
N_t ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	$(2.16 \pm 1.32) \times 10^2$
K_0 (M^{-1})	$(1.19 \pm 1.00) \times 10^3$
R	0.981
Langmuir–Freundlich (LFI)	
N_t ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	$(5.45 \pm 40.13) \times 10^2$
a (M^{-1})	$(2.20 \pm 24.51) \times 10^2$
m	0.94 ± 0.62
R	0.973
Freundlich (FI)	
a ($\mu\text{mol g}^{-1}$) (M^{-1}) ^m	$(9.44 \pm 1.11) \times 10^4$
m	0.92 ± 0.02
R	0.998

To characterize the binding properties of the MIP, we have employed an analytical method (Rampey et al., 2004), which allows the calculation of the affinity distribution (AD) of sites using the linear portion of the binding isotherm when plotted in log–log format (FI), as it occurs in the concentration window under study. Fig. 6 shows the affinity distributions for MIP and NIP. In both cases, an exponentially decaying distribution of binding sites with respect to the association constant is obtained.

A comparison was made between the binding parameters obtained, using this model, for MIP and NIP (Table 5). The MIP results slightly more heterogeneous than NIP, and within the analytical concentration window, the MIP has a number of binding sites 15 times greater than NIP, with an average affinity 35% higher. The population of sites with high association con-

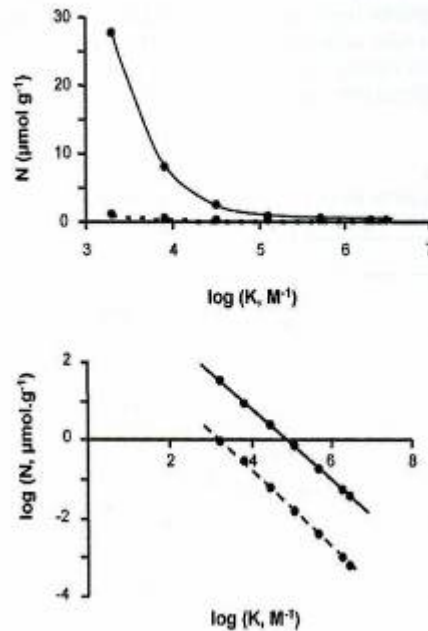


Fig. 6. FI affinity distributions for MIP (—) and NIP (---).

Table 5
Binding parameters, obtained using the AD method, for MIP and NIP

	MIP	NIP
N_{K1-K2} ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	13.02	0.84
K_{K1-K2} (M^{-1})	20389.03	15091.40
$K_{\text{min}}-K_{\text{max}} = 1952-3773585 \text{ M}^{-1}$		

stant ($K_0 > 4 \times 10^5$), although it is only 1% of the total number of sites, is 23 times higher in the molecularly imprinted polymer.

5. Conclusions

The Density Functional Theory approach, developed for the rational design of molecularly imprinted polymers (MIPs), predicts that trifluoromethacrylic acid (TFMAA)/toluene is the combination of functional monomer/solvent that leads to the most stable prepolymerization adducts with homovanillic acid as template. Batch rebinding experiments performed with different MIPs suggest that the structure of the pre-polymerization complexes reflects the structure of the binding sites obtained after polymerization, because the HVA-MIP based on TFMAA presents the highest binding percent for HVA and very low cross reactivity with respect to some structural analogues of the template. The number of binding sites and average affinities, obtained using the affinity distribution method and Freundlich isotherm model, demonstrates that MIP exhibits specific molecular recognition ability towards the template molecule.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Government, MCYT project number CTQ2005-01376. Y.D. thanks the Spanish MCYT for a FPU grant.

References

- Alexander, C., Davidson, L., Hayes, W., 2003. Imprinted polymers: artificial recognition materials with applications in synthesis and catalysis. *Tetrahedron* 59, 2025–2057.
- Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P., 2003. Voltammetric sensor for vanillylmandelic acid based on molecularly imprinted polymer-modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 18, 353–362.
- Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P., 2004. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Trends Anal. Chem.* 23, 36–48.
- Chianella, I., Lotierzo, M., Piletsky, S.A., Tothill, I.E., Chen, B., Karim, K., Turner, A.P.F., 2002. Rational design of a polymer specific for microcystin-LR using a computational approach. *Anal. Chem.* 74, 1288–1293.
- Cossi, M., Barone, V., Cammi, R., Tomasi, J., 1996. Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model. *Chem. Phys. Lett.* 255, 327–335.
- Díaz-García, M.E., Badía, R., 2004. Molecularly imprinted polymers for optical sensing devices. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors 1 (optical sensors), 35–50.
- Diñeiro, Y., Menéndez, M.L., Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tuñón-Blanco, P., 2005. Computational approach to the rational design of molecularly imprinted polymers for voltammetric sensing of homovanillic acid. *Anal. Chem.* 77, 6741–6746.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Zakrzewski, V.G., Montgomery, J.A., Stratmann, R.E., Burant, J.C., Dapprich, S., Millam, J.M., Daniels, A.D., Kudin, K.N., Strain, M.C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cossi, M., Cammi, R., Mennucci, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Ochterski, J., Petersson, G.A., Ayala, P.Y., Cui, Q., Morokuma, K., Malick, D.K., Rabuck, A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Cioslowski, J., Ortiz, J.V., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Gomperts, R., Martin, R.L., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Gonzalez, C., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Andres, J.L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M., Replogle, E.S., Pople, J.A., 1998. Gaussian Inc., Pittsburgh PA.
- Haupt, K., 2003. Molecularly imprinted polymers: the next generation. *Anal. Chem.* 75, 376A–383A.
- Lanza, F., Sellergren, B., 1999. Methods for synthesis and screening of large groups of molecularly imprinted polymers. *Anal. Chem.* 71, 2092–2096.
- Mahony, J.O., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizakoff, B., 2005. Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in Analytical Chemistry. *Anal. Chim. Acta* 534, 31–39.
- Meng, Z., Yamazaki, T., Sode, K., 2004. A molecularly imprinted catalyst designed by a computational approach in catalysing a transesterification process. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1068–1075.
- Piletsky, S., Karim, K., Piletska, E.V., Day, C.J., Freebairn, K.W., Legge, C., Turner, A.P.F., 2001. Recognition of ephedrine enantiomers by molecularly imprinted polymers designed using a computational approach. *Analyst* 126, 1826–1830.
- Rampey, A.M., Umpleby, R.J., Rushton, G.T., Iseman, J.G., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2004. Characterization of the imprint effect and the influence of imprinting conditions on affinity, capacity, and heterogeneity in molecularly imprinted polymers using the Freundlich-isotherm-affinity distribution analysis. *Anal. Chem.* 76, 1123–1133.
- Remcho, V.T., Tan, Z.J., 1999. MIPs as chromatographic stationary phases for molecular recognition. *Anal. Chem.* 71, 248A–255A.
- Rushton, G.T., Karns, C.L., Shimizu, K.D., 2005. A critical examination of the use of the Freundlich isotherm in characterizing molecularly imprinted polymers (MIPs). *Anal. Chim. Acta* 528, 107–113.
- Sellergren, B., 2001. Molecularly Imprinted Polymers: Man-made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry. Elsevier, Amsterdam.
- Spegel, P., Schweitz, L., Nilsson, S., 2003. Molecularly imprinted polymers in capillary electrochromatography: recent developments and future trends. *Electrophoresis* 24, 3892–3899.
- Stevenson, D., 1999. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.* 18, 154–158.
- Subrahmanyam, S., Piletsky, S., Piletska, E., Chen, B., Karim, K., Turner, A.P.F., 2001. Bite-and-switch approach using computationally designed molecularly imprinted polymer for sensing of creatinine. *Biosens. Bioelectron.* 16, 631–637.
- Szabalski, P., Kaczmarski, K., Cavazzini, A., Chen, Y.B., Sellergren, B., Guiochon, G., 2002. Energetic heterogeneity of the surface of molecularly imprinted polymer studied by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 964, 99–111.
- Takeuchi, T., Fukuma, D., Matsui, J., 1999. Combinatorial molecular imprinting: an approach to synthetic polymer receptors. *Anal. Chem.* 71, 285–290.
- Takeuchi, T., Haginaka, J., 1999. Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. B* 728, 1–20.
- Thakur, A.K., Munson, P.J., Hunston, D.L., Roßbard, D., 1980. Characterization of ligand-binding systems by continuous affinity distributions of arbitrary shape. *Anal. Biochem.* 103, 240–254.
- Umpleby, R.J., Bode, M., Shimizu, K.D., 2000. Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Analyst* 125, 1261–1265.
- Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen, Y., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2001a. Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm. *Anal. Chem.* 73, 4584–4591.

Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Bode, M., Berch F.J.K. Jr., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2001b. Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta* 435, 35–42.

Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Rampay, A.M., Rushton, G.T., Chen, Y., Shimizu, K.D., 2004. Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. B* 804, 141–149.

Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R., Mosbach, K., 1993. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* 361, 645–647.

Wu, L., Sun, B., Li, Y., Chang, W., 2003. Study properties of molecular imprinting polymer using a computational approach. *Analyst* 128, 944–949.

Wulff, G., 2002. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chem. Rev.* 102, 1–27.

Anexo II: Tablas

T-1. (Figura 6.5). Variación del potencial de pico del proceso anódico principal del ácido homovanílico con el pH para un electrodo de pasta de carbono. Las medidas se realizaron mediante voltametría cíclica a una concentración de HVA de 2×10^{-4} M. (Se muestran los datos que se ajustan a la variación lineal).

pH	E/V
1.00	0.8063
3.05	0.6980
4.00	0.6569
5.00	0.6300
7.05	0.4884
8.00	0.4610
10.12	0.3570
10.99	0.2956
12.00	0.2956
13.14	0.3078

T-2. (Figura 6.6). Variación de la intensidad de pico del proceso anódico principal del ácido homovanílico frente al pH para un electrodo de pasta de carbono. (Se muestran los datos que se ajustan a la variación lineal).

pH	i/A
1.00	2.30×10^{-5}
3.05	1.35×10^{-5}
4.00	1.13×10^{-5}
4.90	9.50×10^{-6}
6.08	7.50×10^{-6}
7.05	7.17×10^{-6}
8.00	5.43×10^{-6}
9.18	5.47×10^{-6}
10.12	4.10×10^{-6}
10.99	3.96×10^{-6}
12.00	2.82×10^{-6}
13.14	3.35×10^{-6}

T-3. (Pág.127). Variación de la intensidad de pico del proceso anódico principal del ácido homovanílico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potenciales a diferentes concentraciones de analito para un electrodo de pasta de carbono.

$v^{1/2}/(V/s)^{1/2}$	i/A		
	[HVA]= $2 \times 10^{-4} M$	[HVA]= $5 \times 10^{-5} M$	[HVA]= $5 \times 10^{-6} M$
0.07071	6.71×10^{-6}	1.07×10^{-6}	1.16×10^{-7}
0.10000	9.34×10^{-6}	1.44×10^{-6}	1.34×10^{-7}
0.15810	1.41×10^{-5}	2.16×10^{-6}	2.27×10^{-7}
0.22360	1.95×10^{-5}	3.07×10^{-6}	4.01×10^{-7}
0.31620	-	4.14×10^{-6}	-
0.44720	3.49×10^{-5}	4.99×10^{-6}	8.65×10^{-7}
0.70710	-	8.05×10^{-6}	-
1.00000	6.60×10^{-5}	-	-

T-4. (Figura 6.7). Variación de la intensidad de pico anódico del ácido homovanílico con la concentración en un medio de citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10 para un electrodo de pasta de carbono (Se muestran los datos que se ajustan a una recta).

[HVA]/mM	i/ μA
1.00×10^{-4}	8.45×10^{-3}
5.00×10^{-4}	3.58×10^{-2}
1.00×10^{-3}	8.33×10^{-2}
5.00×10^{-3}	3.51×10^{-1}
1.00×10^{-2}	6.65×10^{-1}
1.40×10^{-2}	9.45×10^{-1}
5.00×10^{-2}	3.50
1.00×10^{-1}	6.02
2.00×10^{-1}	12.13
5.00×10^{-1}	26.80
8.00×10^{-1}	33.22
1.00	34.51

T-5. (Figura 6.8). Representación del porcentaje de enlace (B/T) en función de la concentración de polímero a una concentración constante de HVA de 1×10^{-4} M para MIP y NIP sintetizados e incubados en tolueno.

[MIP] mg/mL Tolueno	%(B/T)	[NIP] mg/mL Tolueno	%(B/T)
0.5	13	0.5	0
1.5	25	10.0	6
5.0	39	40.0	36
10.0	46	80.3	51
20.0	55	121.1	62
40.0	65		
80.3	76		
121.1	85		

T-6. (Figura 6.9). Representación del porcentaje de enlace (B/T) en función de la concentración de polímero a una concentración constante de HVA de 1×10^{-4} M para MIP sintetizado e incubado en tolueno y MIP sintetizado e incubado en acetonitrilo.

[MIP] mg/mL Tolueno	%(B/T)	[MIP] mg/mL Acetonitrilo	%(B/T)
0.5	13	0.5	0
1.5	25	1.5	0
5.0	39	5.0	0
10.0	46	10.0	0
20.0	55	20.0	4
40.0	65	60.0	5
80.3	76	120.0	9
121.1	85		

T-7. (Figura 6.10). Representación de log B y log F de MIP y NIP para construir la isoterma de adsorción experimental. B representa la fracción de HVA enlazada al polímero y F la fracción libre o no enlazada.

MIP		NIP	
log(F/M)	log(B, µg/mL)	log(F/M)	log(B, µg/mL)
-1.7001	0.6407	-3.8303	-2.0069
-1.4227	0.8563	-2.7376	-0.7011
-0.6457	1.6739	-1.6623	0.3150
-0.2906	1.8569	-1.4218	0.6129
-3.0963	-0.7387	-0.1644	1.6173
-3.5773	-0.9646		
-2.9995	-0.5499		
-2.3911	-0.0345		
-0.4700	1.8830		

T-8. (Figura 6.11). Distribuciones de afinidad (DA) obtenidas con el MIP y el NIP para la ILF en formato logarítmico (log K vs. log N) y semilogarítmico (log K vs. N).

MIP			NIP		
log(K/M ⁻¹)	N _i (µmol/g)	log N _i	log(K/M ⁻¹)	N _i (µmol/g)	log N _i
-0.8861	0.0417	-1.3797	0.3010	0.0680	-1.1674
-0.8539	0.0448	-1.3486	0.6021	0.2203	-0.6570
-0.8239	0.0479	-1.3197	0.6990	0.5426	-0.2655
-0.7959	0.0510	-1.2925	0.8451	0.7429	-0.1291
-0.7696	0.0541	-1.2669	0.9542	0.9673	-0.0145
-0.7447	0.0572	-1.2428	1.0000	1.6715	0.2231
-0.7212	0.0603	-1.2199	1.1761	2.7338	0.4368
-0.6990	0.0634	-1.1982	1.3010	3.9510	0.5967
-0.5229	0.0945	-1.0247	1.4771	5.2783	0.7225
-0.3979	0.1260	-0.8997	1.5441	6.6776	0.8246
-0.3010	0.1580	-0.8012	1.6532		
-0.2218	0.1907	-0.7197	1.7782		
-0.1549	0.2240	-0.6498	1.9031		
-0.0969	0.2579	-0.5885	2.0000		
-0.0458	0.2925	-0.5339	2.1139		
0.0000	0.3278	-0.4844	2.1614		
0.0792	0.4003	-0.3976	2.2041		
0.1461	0.4755	-0.3228	2.3010		
0.2041	0.5534	-0.2569	2.3979		
0.2553	0.6340	-0.1979	2.4771		
0.3010	0.7171	-0.1444	2.5441		
0.4771	1.1710	0.0685	2.6021		

MIP			NIP		
$\log(K/M^{-1})$	$N_i(\mu\text{mol/g})$	$\log N_i$	$\log(K/M^{-1})$	$N_i(\mu\text{mol/g})$	$\log N_i$
0.6021	1.6850	0.2266	2.6532	8.1170	0.9094
0.6990	2.2551	0.3532	2.6990	9.5702	0.9809
0.7782	2.8775	0.4590	2.7404	11.0160	1.0420
0.8451	3.5486	0.5501	2.7782	12.4374	1.0947
0.9031	4.2653	0.6300	2.8129	13.8213	1.1405
0.9542	5.0247	0.7011	2.8451	15.1573	1.1806
1.0000	5.8241	0.7652	2.8751	16.4380	1.2158
1.1761	10.3380	1.0144	2.8893	17.0558	1.2319
1.3010	15.5339	1.1913	2.9165	18.2438	1.2611
1.3979	21.2159	1.3267	2.9294	18.8133	1.2745
1.4771	27.2331	1.4351	2.9542	19.9019	1.2989
1.5441	33.4673	1.5246	3.0000	21.8759	1.3400
1.6021	39.8249	1.6002	3.0212	22.7617	1.3572
1.6532	46.2315	1.6649	3.0414	23.5814	1.3726
1.6990	52.6282	1.7212	3.0792	25.0298	1.3985
1.7782	65.2132	1.8143	3.1461	27.2254	1.4350
1.8451	77.3112	1.8882	3.2553	29.3819	1.4681
1.9031	88.7597	1.9482	3.3424	29.5427	1.4705
1.9542	99.4678	1.9977	3.3979	28.8912	1.4608
2.0000	109.3925	2.0390	3.4314	28.2333	1.4508
2.0414	118.5233	2.0738	3.4771	27.0423	1.4320
2.0792	126.8712	2.1034	3.5051	26.1665	1.4177
2.1139	134.4612	2.1286	3.5315	25.2571	1.4024
2.1461	141.3273	2.1502	3.5563	24.3339	1.3862
2.1614	144.5009	2.1599	3.5798	23.4112	1.3694
2.1761	147.5084	2.1688	3.6232	21.6072	1.3346
2.2041	153.0462	2.1848	3.6435	20.7390	1.3168
2.2304	157.9834	2.1986	3.6812	19.0884	1.2808
2.2553	162.3620	2.2105	3.6990	18.3096	1.2627
2.2788	166.2233	2.2207	3.7160	17.5629	1.2446
2.3010	169.6066	2.2294	3.7324	16.8482	1.2266
2.3522	176.2147	2.2460	3.7634	15.5131	1.1907
2.3979	180.5902	2.2567	3.7782	14.8911	1.1729
2.4393	183.1748	2.2629	3.7924	14.2981	1.1553
2.4771	184.3322	2.2656	3.8062	13.7329	1.1378
2.5441	183.4969	2.2636	3.8195	13.1945	1.1204
2.6021	179.8433	2.2549	3.8325	12.6817	1.1032
2.6284	177.3352	2.2488	3.8451	12.1931	1.0861
2.6532	174.5165	2.2418	3.8692	11.2844	1.0525
2.6990	168.2587	2.2260	3.9031	10.0753	1.0033
2.7404	161.5488	2.2083	3.9243	9.3600	0.9713
2.7597	158.1253	2.1990	3.9445	8.7087	0.9400
2.7782	154.6943	2.1895	3.9731	7.8373	0.8942
2.8129	154.6943	2.1895	3.9912	7.3184	0.8644
2.8451	141.2582	2.1500	4.0000	7.0757	0.8498
2.8751	134.8701	2.1299	4.0212	6.5131	0.8138
2.9031	128.7664	2.1098	4.0414	6.0075	0.7787
2.9294	122.9663	2.0898	4.0969	4.7673	0.6783

MIP			NIP		
$\log(K/M^{-1})$	$N_i(\mu\text{mol/g})$	$\log N_i$	$\log(K/M^{-1})$	$N_i(\mu\text{mol/g})$	$\log N_i$
3.0000	107.3992	2.0310	4.1461	3.8404	0.5844
3.0212	102.7931	2.0120	4.1761	3.3492	0.5249
3.0414	98.4562	1.9932	4.2304	2.5856	0.4126
3.0792	90.5297	1.9568	4.3010	1.8083	0.2573
3.1461	77.2487	1.8879	4.3424	1.4478	0.1607
3.2553	58.2154	1.7650	4.3617	1.3006	0.1141
3.3424	45.6055	1.6590	4.3802	1.1710	0.0685
3.3979	38.7647	1.5884	4.3979	1.0564	0.0238
3.4314	35.0722	1.5450	4.6990	0.0861	-1.0652
3.4771	30.5066	1.4844	4.8751	-0.0461	
3.7782	11.6534	1.0665	5.0000	-0.0723	
4.0000	5.6551	0.7524	5.3979	-0.0531	
4.3979	1.6402	0.2149	5.6990	-0.0291	
4.6990	0.6997	-0.1551	6.0000	-0.0147	
4.8751	0.4397	-0.3568	6.0414	-0.0133	
5.0000	0.3204	-0.4943	6.1761	-0.0097	
5.3979	0.1233	-0.9089	6.2788	-0.0075	
5.6990	0.0621	-1.2070	6.3979	-0.0057	
6.0000	0.0318	-1.4981	6.6021	-0.0034	

T-9. (Figura 6.12). Distribuciones de afinidad (DA) obtenidas con el MIP y el NIP para la IF en formato logarítmico ($\log K$ vs. $\log N$) y semilogarítmico ($\log K$ vs. N).

MIP			NIP	
$\log(K/M^{-1})$	$N(\mu\text{mol/g})$	$\log N$	$N(\mu\text{mol/g})$	$\log N$
3.3010	27.6182	1.4412	0.8387	-0.0764
3.9031	7.6998	0.8865	0.2126	-0.6724
4.5051	2.1467	0.3318	0.0539	-1.2683
5.1072	0.5985	-0.2230	0.0137	-1.8643
5.7093	0.1669	-0.7777	0.0035	-2.4603
6.3113	0.0465	-1.3324	0.0009	-3.0562
6.4870	0.0320	-1.4942	0.0006	-3.2301

T-10. (Figura 6.14). Representación del porcentaje de enlace (B/T) para MIP y NIP del HVA, VMA, IVMA y MHPE para una concentración de molécula de prueba de 1×10^{-4} M y una concentración de MIP y NIP de 10 mg/mL.

	B/T_{MIP}(%)	B/T_{NIP}(%)	(B/T_{MIP})/(B/T_{NIP})
HVA	46	4	12
VMA	75	78	1
IVMA	63	66	1
MHPE	4	6	1

T-11. (Figura 7.2). Variación de la intensidad de pico anódico del ácido homovanílico con la concentración en un medio de citrato/HCl 0.1 M de pH=1.10 para un electrodo de carbono vitrificado sin modificar.

[HVA]/mM	i/μA
1.00E-04	0.00
5.00E-04	0.03
1.00E-03	0.04
5.00E-03	0.10
1.00E-02	0.28
5.04E-02	2.07
1.00E-01	3.77
2.00E-01	6.50
3.00E-01	8.19
5.05E-01	11.70

T-12. (Figura 7.4). Efecto de t (UV) en el espesor de la capa.

t (UV)/min	Promedio anchura/μm	σ_{n-1}
2.5	234.5	12.3
3	433.2	30.9
4	619.4	13.5
5	620.5	10.9

T-13. (Figura 7.6). Curvas de respuesta para tres MIPes sintetizados tras 1, 2 y 3 minutos de t (UV) después de incubaciones de 15 minutos en disoluciones de HVA en tolueno.

t (UV) = 1 min		t (UV) = 2 min		t (UV) = 3 min	
[HVA]/M	i/A	[HVA]/M	i/A	[HVA]/M	i/A
1.00×10^{-5}	1.54×10^{-7}	1.00×10^{-5}	6.81×10^{-8}	1.00×10^{-5}	4.90×10^{-8}
5.00×10^{-5}	2.12×10^{-7}	2.00×10^{-4}	1.62×10^{-7}	5.00×10^{-5}	7.57×10^{-8}
1.00×10^{-4}	2.33×10^{-7}	4.50×10^{-4}	2.25×10^{-7}	1.00×10^{-4}	7.72×10^{-8}
5.00×10^{-4}	3.84×10^{-7}	8.00×10^{-4}	4.25×10^{-7}	2.00×10^{-4}	1.03×10^{-7}
1.20×10^{-3}	9.54×10^{-7}	1.00×10^{-3}	6.37×10^{-7}	6.00×10^{-4}	2.02×10^{-7}
1.50×10^{-3}	1.01×10^{-6}	3.00×10^{-3}	2.06×10^{-6}	1.00×10^{-3}	2.21×10^{-7}
3.00×10^{-3}	2.07×10^{-6}	5.00×10^{-3}	3.98×10^{-6}	5.00×10^{-3}	3.70×10^{-6}
5.00×10^{-3}	3.08×10^{-6}	1.00×10^{-2}	6.19×10^{-6}	3.00×10^{-3}	2.50×10^{-6}
1.00×10^{-2}	5.20×10^{-6}	3.00×10^{-2}	9.65×10^{-6}	1.00×10^{-2}	6.79×10^{-6}
3.00×10^{-2}	1.96×10^{-5}	1.00×10^{-1}	1.64×10^{-5}	3.00×10^{-2}	1.07×10^{-5}
5.00×10^{-2}	3.06×10^{-5}	1.50×10^{-1}	1.90×10^{-5}	1.00×10^{-1}	1.09×10^{-5}
1.00×10^{-1}	4.18×10^{-5}	2.00×10^{-1}	2.64×10^{-5}	3.00×10^{-1}	1.07×10^{-5}
1.50×10^{-1}	4.36×10^{-5}	3.00×10^{-1}	2.69×10^{-5}		
3.00×10^{-1}	4.67×10^{-5}				

T-14. (Figura 7.8). Representación semi-logarítmica de los calibrados para dos electrodos modificados con polímero molecularmente impreso sintetizados en tolueno y cloroformo tras dos minutos de t (UV).

Tolueno		Cloroformo	
\log ([HVA]/M)	i/A	\log ([HVA]/M)	i/A
-5.0000	8.73×10^{-8}	-3.3010	8.13×10^{-8}
-4.3010	2.13×10^{-7}	-3.0000	1.10×10^{-7}
-4.0000	8.00×10^{-7}	-2.6990	3.12×10^{-7}
-3.6990	1.14×10^{-6}	-2.3010	9.87×10^{-7}
-3.5229	1.50×10^{-6}	-2.0000	1.07×10^{-6}
-3.3010	2.05×10^{-6}	-1.5229	2.76×10^{-6}
-3.0000	6.73×10^{-6}	-1.3010	3.82×10^{-6}
-2.5229	1.10×10^{-5}	-1.0000	3.95×10^{-6}
-2.3010	1.19×10^{-5}	-0.6990	4.40×10^{-6}
-2.0000	2.63×10^{-5}		
-1.3010	3.39×10^{-5}		
-0.6990	3.20×10^{-5}		
-0.5229	3.19×10^{-5}		

T-15. (Figura 7.9). Intensidades de corriente de electrodo modificado con polímero impreso (MIPE) y electrodo modificado con polímero no impreso (NIPE) frente al tiempo de lavado en acetonitrilo en una disolución de HVA de concentración 5×10^{-5} M en tolueno.

t/s	$i_{MIPE}/\mu A$	$i_{NIPE}/\mu A$	i_{MIPE}/i_{NIPE}
2	1.45	0.08	18
3	1.66	0.09	18
4	1.49	0.08	19
5	1.33	0.08	17
6	1.40	0.06	23
7	1.33	0.06	22
8	1.40	0.09	16
9	1.69	0.08	21
10	1.66	0.09	18

T-16. (Pág. 175). Intensidades de corriente de un electrodo modificado con polímero impreso (MIPE) frente al tiempo de equilibrio en el medio de medida (citrato/HCl 0.1 M pH=1.10) tras una incubación en una disolución de HVA de concentración 5×10^{-5} M en tolueno.

t/s	i/A
0	2.82×10^{-7}
5	2.37×10^{-7}
10	1.40×10^{-7}
15	1.35×10^{-7}

T-17. (Figura 7.10). Gráficas de calibración para dos MIPes sintetizados con TFMAA y MAA en tolueno para un valor de t (UV) de un minuto.

[HVA]/μM	$i_{\text{MIPE-MAA}}/\mu\text{A}$	$I_{\text{MIPE-TFMAA}}/\mu\text{A}$
0.01	0.05	0.09
0.05	0.06	0.09
0.10	0.06	0.10
0.50	0.10	0.15
2.00	0.17	0.25
3.00	0.22	0.31
5.00	0.30	0.43
8.00	0.39	0.59
10.00	0.52	0.69
20.00	0.61	0.91
30.00	0.83	1.25
50.00	1.05	1.45
100.00	1.36	1.69

T-18. (Figura 7.11). Influencia del porcentaje de isooctano en el t (UV) necesario para iniciar la polimerización.

% Isooctano	t (UV) /min
0	10
25	13
50	20
75	25
100	30

T-19. (Figura 7.12). Influencia del porcentaje peso/volumen de PVAC en el t (UV) necesario para iniciar la polimerización.

%PVAC	t (UV) /min
0	10
2	7.5
4	7
10	6

T-20. (Figura 7.13). Variación de la intensidad de corriente con el porcentaje peso/volumen de polivinilacetato (PVAC) para una capa sintetizada con diglyme como disolvente porogénico. La incubación se realizó en una disolución de HVA de concentración 4.76×10^{-4} M en diglyme.

%PVAC	i/A	σ_{n-1}
0	0.26×10^{-6}	0.2×10^{-7}
2	0.23×10^{-6}	0.1×10^{-7}
4	0.20×10^{-6}	0.1×10^{-7}
10	0.16×10^{-6}	0.1×10^{-7}

T-21. (Figura 7.14). Variación de la intensidad de corriente con el porcentaje de isooctano para una capa sintetizada con diglyme como disolvente porogénico. La incubación se realizó en una disolución de HVA de concentración 4.76×10^{-4} M en diglyme.

%Isooctano	i/A	σ_{n-1}
0	0.26×10^{-6}	0.2×10^{-7}
25	0.13×10^{-6}	0.1×10^{-7}
50	0.11×10^{-6}	0.2×10^{-7}
75	0.10×10^{-6}	0.1×10^{-7}
100	0.10×10^{-6}	0.1×10^{-7}

T-22. (Figura 7.15). Variación de la intensidad de corriente con el porcentaje de isooctano para una capa sintetizada con tolueno como disolvente porogénico. La incubación se realizó en una disolución de HVA de concentración 4.76×10^{-4} M en tolueno

%Isooctano	i/A	σ_{n-1}
0	1.76×10^{-6}	0.8×10^{-7}
25	0.73×10^{-6}	0.6×10^{-7}
50	0.61×10^{-6}	0.2×10^{-7}
75	0.52×10^{-6}	0.5×10^{-7}
100	0.10×10^{-6}	0.1×10^{-7}

T-23. (Figura 7.16). Variación de la intensidad de corriente con la naturaleza del disolvente de incubación para capas sintetizadas en tolueno y capas sintetizadas en diglyme, respectivamente.

Dvte. incubación	Dvte. porogen: tolueno		Dvte. Porogen: diglyme	
	Promedio i/A	σ_{n-1}	Promedio i/A	σ_{n-1}
Tolueno	1.76×10^{-6}	0.9×10^{-7}	0.15×10^{-6}	0.7×10^{-7}
Diglyme	0.19×10^{-6}	0.4×10^{-7}	0.26×10^{-6}	0.9×10^{-7}

T-24. (Figura 7.17). Variación de la corriente de pico de un electrodo modificado con polímero impreso (MIPE) frente al tiempo de incubación en tolueno para una concentración de HVA de 5×10^{-5} M.

t/min	$i_{MIPE}/\mu A$
0	0.00
1	0.20
2	0.60
3	0.80
5	1.14
10	1.55
15	1.82
20	2.02
30	2.20
40	2.20

T-25. (Figura 7.19). Variación de la intensidad de pico anódico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de potenciales a una concentración de HVA de 0.1 M.

$V^{1/2}/(mV/s)^{1/2}$	$i/\mu A$
2.2361	4.80E+01
3.1623	5.20E+01
4.4721	8.08E+01
6.0000	1.09E+02
7.0711	1.26E+02
10.0000	1.70E+02
14.1421	2.20E+02
22.3607	3.30E+02
31.6228	4.26E+02

T-26. (Figura 7.21). Representación del inverso de las intensidades de corriente de difusión frente al inverso de la raíz cuadrada de la velocidad de rotación para tres MIPes de la misma composición sintetizados a tres t (UV) distintos (180, 60 y 30 segundos) y para un NIPE sintetizado a 180 segundos, para una concentración de HVA de 1×10^{-3} M.

t (UV) /s	MIP		NIP	
	$w^{-1/2}/$ (rad/s) ^{-1/2}	i^{-1}/A^{-1}	$w^{-1/2}/$ (rad/s) ^{-1/2}	i^{-1}/A^{-1}
30	0.1382	42837.7400		
	0.0977	36886.4900		
	0.0798	34618.4900		
	0.0691	33444.8200		
	0.0618	32615.6800		
	0.0564	32051.2800		
60	0.1382	121657.5000		
	0.0977	100494.4000		
	0.0798	89802.8800		
	0.0691	81124.0500		
	0.0618	72251.2000		
	0.0564	64684.3100		
180	0.1382	436662.2000	0.1382	2350011.0000
	0.0977	351838.9000	0.0977	1517174.0000
	0.0798	305408.8000	0.0798	1252097.0000
	0.0691	288184.4000	0.0691	1120976.0000
	0.0618	276419.5000	0.0618	995787.8000
	0.0564	259776.0000	0.0564	892100.5000

T-27. (Figura 7.25). Variación de la intensidad de pico anódico con la concentración de HVA para un MIPE y un NIPE sintetizados tras un valor de t (UV) de un minuto.

[HVA]/μM	i_{MIPE}/μA	I_{NIPE}/μA
0.01	0.09	0.00
0.05	0.09	0.00
0.1	0.10	0.00
0.5	0.15	0.00
2	0.25	0.00
3	0.31	0.00
5	0.43	0.03
8	0.59	
10	0.69	0.04
20	0.91	
30	1.25	
50	1.45	0.07
100	1.69	0.10

T-28. (Figura 7.26). Gráfica de calibración en formato semilogarítmico obtenida mediante DPV para un MIPE sintetizado a un valor de t (UV) de un minuto.

$\log([HVA]/\mu$M)	i/μA
-2.00	0.09
-1.30	0.09
-1.00	0.10
-0.30	0.15
0.30	0.25
0.48	0.31
0.70	0.43
0.90	0.59
1.00	0.69
1.30	0.91
1.48	1.25
1.70	1.45
2.00	1.69
2.70	1.88
3.08	1.88
3.18	2.01
3.48	2.17
3.70	3.18
4.00	5.20
4.48	19.60
4.70	30.60
5.00	41.80
5.18	43.60
5.48	46.70

T-29. (Figura 7.28). Intensidades de corriente para un electrodo modificado con polímero molecularmente impreso sintetizado tras 3 minutos de t (UV) e incubado en una concentración de 5×10^{-3} M en tolueno de las distintas especies interferentes estudiadas.

	i/A
HVA	1.18×10^{-6}
VMA	1.64×10^{-6}
IVMA	1.47×10^{-6}
MHPE	0.32×10^{-6}

T-30. (Figura 7.30). Curva de adiciones estándar para un electrodo de carbono vitrificado sin modificar en orina diluida 1:10 con citrato/HCl de concentración 0.1 M y pH=1.10.

[HVA]/M	i/A
0	6.47×10^{-7}
4.52×10^{-5}	3.83×10^{-6}
1.95×10^{-4}	7.89×10^{-6}
3.61×10^{-4}	9.31×10^{-6}