

Caracterización de un Polímero de Impronta Molecular para la ampicilina por NIR.

Comparación entre NIR y FT-IR

Beatriz E. Soledad-Rodríguez
bsoledad@ucab.edu.ve

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

Historia del Artículo

Recibido 13 de marzo de 2018

Aceptado 10 de julio de 2018

Disponible online: 13 de Julio de 2018

Resumen: Los Polímeros de Impronta Molecular (MIPs) tienen propiedades de reconocimiento molecular selectivo que los hacen altamente sensibles y con una alta selectividad y afinidad por el analito. Esta técnica está basada en la preparación de un polímero entrecruzado alrededor de un analito utilizado como molécula molde, en el cual el analito se pone en contacto con los monómeros adecuados con el fin de formar el polímero. Una vez obtenido, se extrae la molécula molde, y se liberan los sitios de reconocimiento específico. Es debido a estos sitios dentro de la matriz del polímero (complementarios a la molécula bajo análisis en la forma y posición de los grupos funcionales), que ocurre el reconocimiento molecular selectivo. Un MIP puede caracterizarse químicamente, morfológicamente y a través de los sitios de unión específica. La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), proporciona información cualitativa sobre la composición del MIP, como por ejemplo, los grupos funcionales. En este trabajo se presenta una comparación entre los espectros del infrarrojo cercano (NIR) y FT-IR de MIPs altamente selectivos para la ampicilina, confirmando que es posible caracterizar un MIP empleando los espectros NIR.

Palabras Clave: Polímeros de Impronta Molecular, Caracterización de MIP, Espectroscopia FT-IR, Espectroscopia NIR, Ampicilina

Characterization of a Molecularly Imprinted Polymer for ampicillin by NIR. Comparison between NIR and FT-IR

Abstract: Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) have selective molecular recognition properties that make them highly sensitive and with high selectivity and affinity for the analyte. This technique is based on the preparation of a polymer crosslinked around an analyte used as a template molecule, in which the analyte is contacted with the appropriate monomers in order to form the polymer. Once obtained, the template molecule is extracted, and the specific recognition sites are released. It is because of these sites within the polymer matrix (complementary to the molecule under analysis in the form and position of the functional groups), that selective molecular recognition occurs. A MIP can be characterized chemically, morphologically and through the specific binding sites. Infrared spectroscopy with Fourier transform (FT-IR) provides qualitative information about the composition of the MIP, such as, for example, the functional groups. In this paper, a comparison between the near-infrared (NIR) and FT-IR spectra of highly selective MIPs for ampicillin is presented, confirming that it is possible to characterize a MIP using the NIR spectra.

Keywords: Molecularly Imprinted Polymers, MIP Characterization, FT-IR Spectroscopy, NIR Spectroscopy, Ampicillin

I. INTRODUCCIÓN

La administración de antibióticos tanto en animales como en seres humanos es imprescindible para combatir diferentes patologías originadas por bacterias [1]. La utilización de fármacos y agroquímicos en el campo agroalimentario y ganadero es necesaria para minimizar los riesgos que tienen los animales para contraer diversas enfermedades como consecuencia de la infección por uno o varios microorganismos [2] [3], sin embargo, se tiene el efecto adverso, donde los productos obtenidos del animal y sus derivados tienen residuos del antibiótico, los cuales al ser ingeridos por el ser humano, crean resistencia bacteriana acarreando graves consecuencias en el organismo.

El Comité Mixto de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [4], en su informe técnico N° 799 establece, que se deben tener en cuenta varios factores para delimitar las concentraciones máximas de residuos de un compuesto determinado. El primer paso para establecer la máxima concentración de residuos recomendada o LMR, es la determinación de una ingesta diaria admisible (IDA) basada en los datos toxicológicos disponibles, y la finalidad de estos estudios es proteger al consumidor y a los sectores de la población que trabajan con animales que generan alimento para consumo humano, por lo cual es necesario establecer la cantidad de alimento consumido. Señala el comité que una persona de 60 kg debe ingerir diariamente las siguientes cantidades de alimentos: 300 g de carne (como tejido muscular), 100 g de hígado, 50 g de riñones, 50 g de grasa de los tejidos, 100 g de huevos y 1,5 L de leche, por ello el Comité basó sus recomendaciones en esos valores de ingesta diaria. Dado que pueden ocurrir reacciones en individuos muy sensibles, el comité recomendó mantener la concentración más baja posible de residuos de medicamentos con propiedades alergénicas conocidas o presuntas, particularmente de penicilina y otros antibióticos β -lactámicos, quedando el LMR para la ampicilina en 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

A pesar de las normas establecidas, los antibióticos son utilizados de manera excesiva para la alimentación del ganado [5]. Al ingerir el antibiótico, los organismos no son capaces de absorberlos en su totalidad y parte de ellos se excretan en las heces y orinas, estos desechos son vertidos en las aguas servidas que se conectan con ríos, lagos y mares, permaneciendo en ese medio y ocasionando múltiples consecuencias para diversas formas de vida, la composición química del agua se ve alterada, incrementando la resistencia por parte de bacterias a ciertos antibióticos, también organismos acuáticos se ven perjudicados, lo que es un claro indicio de lo ineficiente que son las tecnologías de tratamiento de aguas residuales [6].

Al ambiente llega un gran cúmulo de sustancias químicas de origen antropogénico [7], de un total de 200 antibióticos, un 52% se destina a consumo humano y el 48% restante se emplean a nivel veterinario, para el año 2009, el 62,6% del consumo de antibióticos se concentraba en las penicilinas. Los antimicrobianos alcanzan el medio principalmente a través de las aguas residuales tras su uso terapéutico doméstico y la cantidad de residuos de antibiótico presentes va a depender de la frecuencia y cantidad de su dosificación, el tipo de patrón

de excreción del compuesto original, su metabolismo, la afinidad del fármaco o sus metabolitos a ser absorbidos por la materia orgánica (propiedades fisicoquímicas del principio activo) y la capacidad de transformación metabólica de los microorganismos de las Estaciones Depuradoras de las Aguas Residuales (EDARs). El tratamiento en las plantas depuradoras, hace que estos residuos de antibióticos alcancen directamente los ríos y aguas superficiales, así como sus sedimentos, y a pesar de que la concentración de fármacos en el medio es muy baja, encontrándose en el orden de $\mu\text{g kg}^{-1}$, éstos continúan presentando actividad.

En las instalaciones hospitalarias, una gran cantidad de antibióticos se consumen habitualmente y una vez administrados a los pacientes, son excretados a las aguas residuales de los hospitales, que deberían ser estrictamente tratadas en las plantas depuradoras antes de verterlas a una fuente fluvial [8]. En la actualidad se está trabajando en cartuchos de filtración para estos contaminantes para que puedan ser retenidos antes de que lleguen a los efluentes.

Uno de los principales problemas que podría estar generando la exposición a los antibióticos es la inducción en la aparición de resistencias. De esta forma bacterias patógenas o no, pueden servir como reservorio de genes de resistencia y contribuir de este modo a la evolución y diseminación de estas resistencias en el medio, que luego se transmitirá a animales y alimentos, y de estos al hombre.

Los estudios que se realizan para la evaluación de riesgo de residuos de antibióticos ya sea en alimentos o ambiente, se llevan a cabo para garantizar la seguridad a nivel de salud pública. Para ello se debe realizar un análisis de los posibles riesgos que estos residuos generan y establecer ciertos parámetros que regulen el uso de antibióticos en zootecnia, de manera que no genere repercusiones en la salud de los individuos.

Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, la importancia de analizar la presencia de residuos en el ambiente, implica llevar a cabo una serie de fases para la evaluación de los riesgos [9], donde en la primera fase se deben identificar claramente los residuos que no necesitan más pruebas, para los otros será necesario introducir una segunda fase de pruebas para que de esa manera se obtenga información adicional sobre la base de la cual se podrá considerar necesario llevar a cabo otros estudios.

La necesidad de controlar la presencia de estos antibióticos a niveles de $\mu\text{g kg}^{-1}$, requiere disponer de métodos analíticos sensibles y selectivos capaces de alcanzar los límites requeridos por la legislación vigente [10] según el Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, Commission of the European Communities, y en la actualidad, los métodos de análisis más empleados para la determinación de estos compuestos son los métodos cromatográficos (HPLC, CG) con distintos detectores [11].

Como los residuos de AMP usualmente se encuentran en muy bajas concentraciones, es necesario un paso previo de pre-concentración de la muestra para incrementar la eficiencia y sensibilidad del análisis instrumental, es por ello que se requieren equipos con alta sensibilidad y el investigador debe enfocarse en la estandarización de métodos que permitan determinar el analito a bajas

concentraciones, contribuyendo a mejorar las técnicas de análisis, haciéndolas más rápidas, efectivas y que puedan ser aplicadas para diversas muestras. Estas nuevas estrategias de análisis y determinación de muestras pueden ser aplicadas en diversos laboratorios y para ello deben ser validadas determinando las características analíticas del método, entre ellas: los tiempos de retención, límite de detección, linealidad del método, reproducibilidad, repetibilidad y porcentaje de recuperación.

Esta investigación fue llevada a cabo utilizando AMP, un antibiótico β -lactámico perteneciente al grupo de las penicilinas, ya que constituye uno de los grupos de mayor utilización a nivel mundial.

Para la determinación de AMP en soluciones acuosas a baja concentración, se utilizó el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección en el Ultravioleta (UV), porque es la técnica de separación más utilizada para la determinación de antibióticos, aumenta la eficiencia en las separaciones de los analitos, y permite su separación eficaz contribuyendo a la determinación de residuos de antibióticos con tiempo de análisis cortos [12].

A. Caracterización de los MIPs

Los MIPs son sólidos amorfos, de gran diversidad estructural, químicamente homogéneos e insolubles. La aplicación adecuada de estos polímeros requiere de una caracterización precisa de sus propiedades superficiales y estructurales. [13, 14, 15, 16].

1. Caracterización química:

Dentro de la caracterización química se encuentra: el análisis elemental, empleado para conocer en el polímero el porcentaje en masa de Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno, Azufre, y otros elementos; la espectroscopia de absorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis), utilizada para conocer la relación estequiométrica de monómeros-molécula molde y el efecto que produce la adición de entrecruzante en la etapa de prepolimerización; la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), que proporciona información cualitativa sobre la composición del MIP, como por ejemplo, los grupos funcionales, así como la existencia de interacciones no-covalentes, como los puentes de hidrógeno y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), que proporciona información sobre los distintos carbonos presentes en la red polimérica y determina el número de dobles enlaces que quedan sin reaccionar en el polímero, así mismo se obtiene información de la mezcla de prepolimerización, sobre la estabilidad de los complejos monómero-molécula molde formados.

El empleo de la espectroscopia IR, permite identificar de una manera rápida y fácil los principales componentes de un compuesto orgánico [17, 18] pues indica los diversos grupos funcionales que se encuentran en la molécula. De esta manera ayuda a conocer la estructura de un nuevo compuesto.

Al analizar por espectroscopia IR a los MIPs, se comparan las estructuras de los monómeros funcionales, los entrecruzantes, las moléculas molde, los MIPs (tanto a los que se les ha extraído la molécula molde como a los que no), y a los polímeros no impresos [19, 20, 21, 22, 23, 24] y los diversos grupos funcionales presentes en las matrices poliméricas.

Con relación al análisis espectroscópico cabe señalar que la región del infrarrojo está comprendida entre las

longitudes de onda de 700 a 106 nm, y tanto por razones instrumentales como por las características de interacción con la materia, esta región se divide en tres zonas: la NIR, (Near InfraRed) comprendida entre 700 y 2500 nm, que corresponde al infrarrojo cercano; la MIR, (Middle InfraRed), que va desde 2550 a 50000 nm, que corresponde al infrarrojo medio y la FIR (Far InfraRed), la comprendida entre 50000 y 106 nm, que corresponde al infrarrojo lejano.

En los últimos años ha aumentado considerablemente el número de aplicaciones de la espectroscopia en la región NIR pues tiene como ventajas la posibilidad de registrar el espectro de muestras en estado sólido, líquido y gas, el registro es muy rápido y no es necesaria la preparación ni la destrucción de la muestra. Por este motivo se evaluarán los espectros NIR de los MIPs sintetizados y se compararán con los espectros obtenidos por FT-IR.

2. Caracterización morfológica:

Los métodos analíticos comúnmente usados para la caracterización morfológica de un polímero son: la porosimetría, por medio de la cual se obtiene información del área de superficie específica ($m^2 g^{-1}$), el volumen de poro específico ($mL g^{-1}$), la distribución del tamaño de poros, y del diámetro medio de los poros; la cromatografía de exclusión molecular inversa (ISEC, Inverse Size Exclusion Chromatography) [25] que proporciona información sobre la arquitectura porosa del MIP como fase estacionaria sobre la que se separan polímeros solubles de distribución de pesos moleculares conocidos; la microscopía de fuerza atómica (AFM, Atomic Force Microscopy) [26] que proporciona un perfil topográfico tridimensional cuantitativo de la superficie, también proporciona la diferencia entre la fase amorfa y la cristalina de un polímero semicristalino, y entre homopolímeros y copolímeros, y proporciona un estudio de las propiedades mecánicas. La microscopía electrónica de barrido, que da información sobre la morfología de las partículas poliméricas y de los macroporos superficiales, también proporciona información sobre si las partículas son granulares o esféricas, entre otras.

3. Caracterización de los sitios de unión específica: isotermas de adsorción:

Existen modelos matemáticos de isotermas de adsorción que se han aplicado a la caracterización de MIPs. Estos modelos pueden ser discretos o de distribución continua. Entre los modelos discretos se encuentran los modelos de Langmuir y de Jovanovic y entre los modelos de distribución continua se encuentran el de Freundlich, Freundlich-Langmuir y Freundlich-Jovanovic.

B. Espectroscopia NIR

La espectroscopia NIR, del acrónimo en inglés Near InfraRed, se utiliza entre otros en el campo agroalimentario, textil, petroquímico, farmacéutico, polímeros, seguridad y defensa [27, 28]. Esta técnica tiene la capacidad de analizar muestras de un modo no destructivo ni invasivo, sin tratamiento previo y permite la obtención rápida de resultados analíticos y el tiempo de análisis es de 1 a 2 segundos.

Los instrumentos NIR permiten registrar el espectro tanto de muestras sólidas, como líquidas y gaseosas y dependiendo del equipo el espectro obtenido puede ser de Transmitancia, Reflectancia y Transreflectancia.

Las bandas más frecuentes en la región del NIR son debidas a enlaces que contienen átomos con elevadas diferencias en el peso molecular (por ejemplo C-H, O-H, N-H, entre otros) mientras que las bandas de los grupos C=O, C-C, C-F, C-Cl en general son muy débiles o no aparecen en la región NIR.

El espectrómetro usa un policromador (rejilla de difracción eléctricamente programable). La Espectroscopia de Transformada Digital es una nueva técnica en la cual el espectro conseguido, se dispersa a través de un sistema micro electromecánico de difracción. La luz se puede bloquear en regiones específicas del espectro mientras se refleja en otras. La luz reflejada es luego colectada y recombinada sobre un foto detector sencillo. Posteriormente esta puede convertirse en un espectro completo como se muestra en la Figura 1.

Jackson, USA). El Ácido Acético (Fluka, Alemania). Fosfato monobásico de potasio (Riedel-de Hæn, Alemania). Nitrógeno gaseoso (AGA, Venezuela). La AMP grado USP fue donada por Laboratorios Spedar, Venezuela. El peróxido de hidrógeno al 30 % fue obtenido de PERDROGEN® Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El ácido metacrílico (MAA), el metacrilato de metilo (MMA) y el etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) fueron comprados de Advance Scientific and Chemical Inc. (Florida, USA)

Las disoluciones patrón de la AMP a 1 g L⁻¹ fueron preparadas pesando semanalmente la cantidad exacta del polvo y disolviéndolo en 100 mL de diluyente (agua: KH₂PO₄ 1 M: ácido acético 1 N, 989:10:1 v/v) y guardadas a 4 °C en la oscuridad siguiendo el método de United States Pharmacopeia and National Formulary [29], como se indica en [12] para los análisis por HPLC.

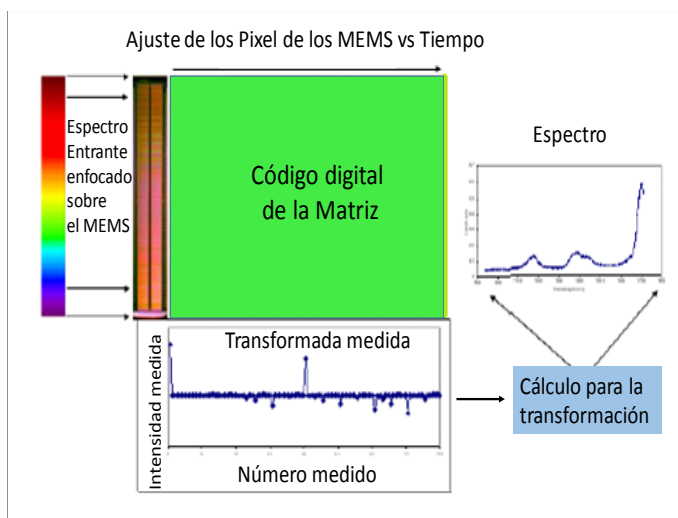


Figura 1. Obtención de un espectro NIR

El espectro NIR contiene información tanto química como física de la muestra analizada, lo que permite desarrollar métodos para el análisis cualitativo que permitan discriminar una muestra de otra.

La espectroscopia de reflectancia estudia la radiación reflejada por una muestra que ha estado irradiada. La señal analítica medida se expresa como absorbancia aparente:

$$A_{ap} = \log \frac{1}{R} = ac$$

Siendo R la reflectancia relativa ($R = R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}$), a es una constante de proporcionalidad y c es la concentración.

II. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo de investigación fue caracterizar un MIP elaborado para la determinación de ampicilina (AMP), por medio de la espectroscopia NIR y comparar estos espectros con los obtenidos por FT-IR.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Reactivos y soluciones

Los disolventes grado HPLC fueron el acetonitrilo (ACN) (Sigma-Aldrich, Alemania) y el Metanol grado (Burdick y

B. Materiales y Equipos

Los materiales y equipos utilizados en este trabajo de investigación fueron: para el análisis por FT-IR se empleó un espectrómetro IR con transformada de Fourier Nicolet 380 (Thermo Electron Corporation, USA). Para el análisis por NIR se utilizó un Polychromix, Modelo Phazir, calibrado con un vial vacío. El software utilizado para el análisis de la data es el Phazir Method Generator versión 1.6.3.0.

C. Síntesis del MIP

El MIP fue preparado por la técnica de polimerización, de acuerdo a una aproximación no covalente [12], usando MAA o MMA como monómeros funcionales, EGDMA como monómero entrecruzante, ACN como disolvente porogénico y peróxido de hidrógeno como iniciador (Tabla 1), utilizando la siguiente relación molar molécula molde/monómero/entrecruzante (0.010 gramos de AMP (2.2 mM) fue disuelta en ACN (10 mL) en un tubo de vidrio y se agitó en un vortex brevemente a 50 °C, hasta completa disolución. Luego se le añadió el monómero funcional y se mezcló en un vortex por 1 minuto y se colocó en un baño ultrasónico por 5 minutos. El EGDMA y el peróxido de hidrógeno (2% v/v) se añadieron a la mezcla anterior y se agitaron en el vortex por 1 minute y en un baño ultrasónico por 2 minutos. Se purgó con nitrógeno por 3 minutos y se selló antes de colocarlo a 28° C bajo luz UV (UVS-54 lamp, Mineralight®Lamp, USA) por 24 horas. El polímero obtenido fue removido del tubo de ensayo empleando una espátula y agua destilada y se colocó en un mortero, se trituroó y se tamizó húmedo en un tamiz de acero inoxidable con tamaño de poro de 300 µm. Luego se filtró para remover el líquido y se lavó con etanol y posteriormente con metanol. Se extrajo la molécula molde con metanol-ácido acético 1 N (9:1 v/v) en un baño de agua a 55 °C por 6 horas. Se evaluó la presencia de AMP por HPLC-UV, comparando el cromatograma del eluato con el obtenido de la disolución patrón de AMP. El procedimiento se repitió hasta que no se detectó la molécula molde en el disolvente de extracción. Posteriormente, el MIP se secó al aire y se colocó en un desecador hasta su uso. Se preparó un polímero no impreso (NIP), en iguales condiciones pero sin la molécula molde, con propósitos comparativos.

La composición de los MIPs sintetizados en cuanto a la relación molar se presenta en la Tabla 1.

compuestos puros como de los MIPs y NIPs sintetizados (1, 2, 3, 4, 5, y 6).

Tabla 1: Composición de los MIPs sintetizados señalando la relación molar entre los constituyentes del polímero

Código del polímero	Molécula molde	Monómero funcional		Monómero entrecruzante EGDMA
		MAA MMA		
1	1	-	100	500
2	1	50	50	500
3	1	100	-	500
4	1	100	-	200
5	1	100	-	100
6	1	100	-	50

D. Caracterización del MIP

Para efectuar la caracterización de los MIPs estudiados, se emplearon las siguientes técnicas para determinar su estructura.

La estructura de las diferentes moléculas empleadas en la síntesis de los polímeros se presenta en Figura 2. Es importante señalar que en la caracterización de los polímeros por espectroscopia NIR y FT-IR, se evalúan los diferentes grupos funcionales presentes en los MIPs y en particular al pico correspondiente al grupo $-C=C-$ presente en los monómeros, y el cual se presenta disminuido en el MIP debido al proceso de polimerización, al igual que el grupo $-C=O$ del etilenglicol metacrilato como molécula entrecruzante.

Por otra parte, se observa la huella de la ampicilina en los MIPs, dado que es la molécula plantilla.

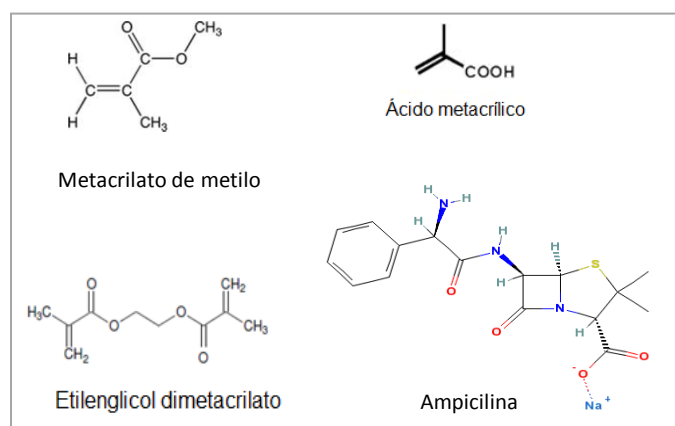


Figura 2: Estructura de las diferentes moléculas empleadas en la síntesis de los diversos polímeros estudiados.

1. Espectroscopia NIR:

Con la finalidad de evaluar a los diferentes polímeros sintetizados, se estudiaron los espectros NIR tanto de los

Primeramente con propósitos comparativos, se obtuvo los espectros NIR de la AMP, EGDMA, MAA y MMA.

Las muestras líquidas (para los monómeros funcionales y el monómero entrecruzante), se colocaron en un tubo de vidrio y se obtuvo el espectro, mientras las muestras sólidas fueron tomadas directamente apuntando el haz de luz a la muestra; el ensayo no es destructivo. El equipo utilizado es el Polychromix, Modelo Phazir, calibrado con un vial vacío. El software utilizado para el análisis de la data es el Phazir Method Generator versión 1.6.3.0 (Figura 3).



Figura 3: Equipo Polychromix, Modelo Phazir para análisis NIR utilizado para la realización de los espectros tanto de las muestras sólidas como las líquidas.

2. Espectroscopia FT-IR:

Para evaluar a los diferentes polímeros sintetizados, por espectroscopia FT-IR tanto de los compuestos puros como de los MIPs y NIPs sintetizados, se mezcló el polímero con KBr sólido puro y seco en un mortero hasta obtener un polvo fino, utilizando una relación en peso de 1:100 muestra/KBr. Se colocó una pequeña porción del polvo obtenido en un portador de muestra para preparar pastillas, empleando para ello la prensa. Se colocó la pastilla (homogénea y finísima) en una placa para muestras. Se insertó el porta muestra en el espectrómetro Nicolet, modelo 380 operado en modo de transformada de Fourier, empleando un intervalo espectral de 4000-400 cm^{-1} y una resolución 4 cm^{-1}

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los espectros realizados.

A. Caracterización estructural de los polímeros sintetizados

Con la finalidad de evaluar los diferentes polímeros sintetizados tanto por espectroscopia NIR como por FT-IR, se realizaron los espectros tanto de los compuestos puros como de los polímeros molecularmente impresos (MIPs) y sus correspondientes blancos (NIPs). Los espectros FT-IR de la ampicilina y los monómeros funcionales y entrecruzante se compararon con los espectros encontrados en la bibliografía.

B. Comparación entre los espectros NIR y FT-IR de los componentes de la mezcla de polimerización

A continuación se presentan los espectros NIR y FT-IR de los compuestos puros presentes en la mezcla de polimerización.

C. Análisis de los espectros NIR de los componentes de la mezcla de polimerización

El análisis de los espectros NIR de los compuestos puros se presenta a continuación, y la longitud de onda en la cual se observan las señales en el equipo empleado para las mediciones corresponde al rango de 1500 a 2500 nm. El espectro NIR obtenido para la AMP se muestra en la Figura 4.

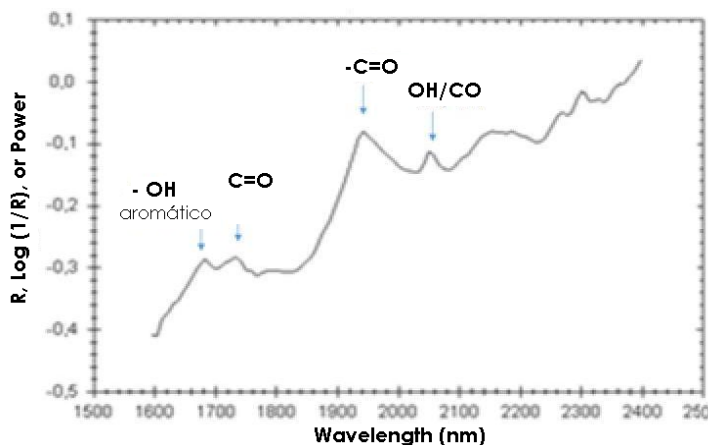


Figura 4: Espectro NIR de la AMP.

En este espectro se observan las vibraciones correspondientes al C=O presentes en el rango de los 1700-1790 nm. En el rango de los 1650 nm se presenta un pico correspondiente al -OH aromático, en 1900 nm se presenta un pico correspondiente al -C=O, y cercano a los

2100 se presenta un "stretch" de la combinación -OH/-CO (estos resultados del espectro NIR para la AMP son comparables con los encontrados por Luner y colaboradores [30] y [31])

Con relación al monómero entrecruzante, el espectro obtenido del EGDMA se presenta en la Figura 5.

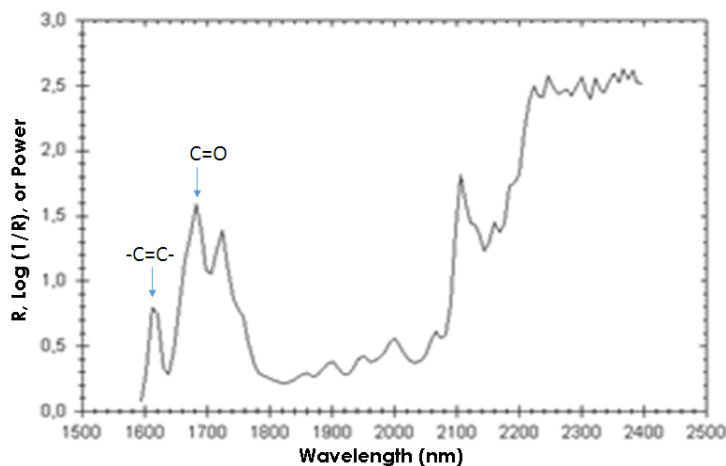


Figura 5. Espectro NIR del EGDMA.

Es este espectro se observa el pico alrededor de 1700 cm^{-1} correspondiente al grupo C=O, también se observa el pico correspondiente al enlace C=C alrededor de los 1600 nm.

Para el MAA, en la Figura 6, se observa en 1700 nm la señal característica del C=O y en 1600 nm la señal correspondiente al C=C.

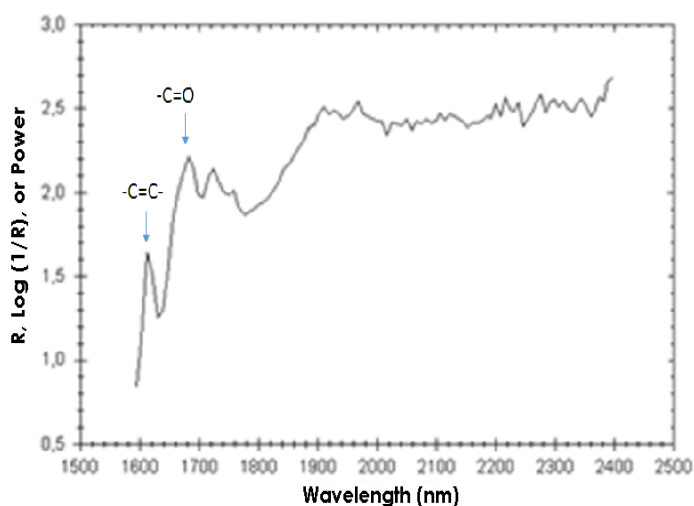


Figura 6: Espectro NIR del MAA.

El espectro NIR del MMA se presenta en la Figura 7, observándose el pico correspondiente al C=O en 1700 nm, el del C=C en 1600 nm.

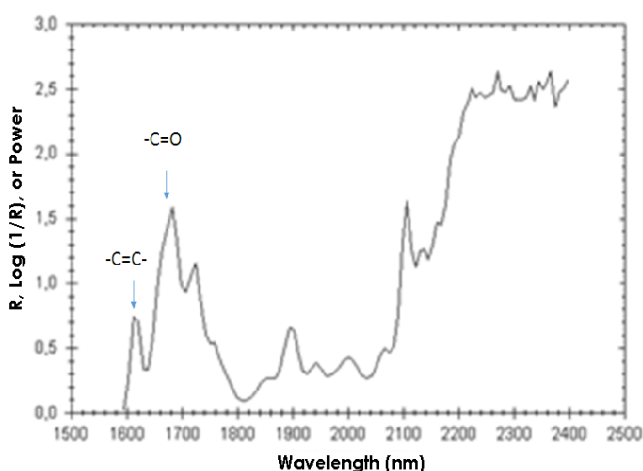


Figura 7: Espectro NIR del MMA.

D. Análisis de los espectros FT-IR de los componentes de la mezcla de polimerización

Los espectros de IR característicos de los compuestos empleados en la síntesis se han obtenido de la bibliografía con objeto de compararlos con los obtenidos en el laboratorio. En la Figura 8 se presenta el espectro FT-IR de la AMP obtenido de la fuente bibliográfica [32],

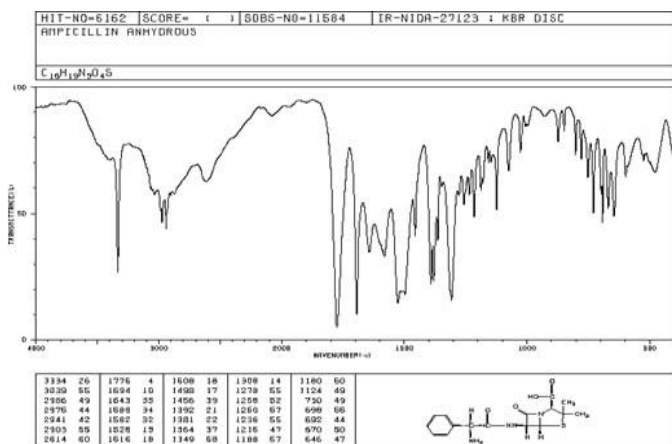


Figura 8: Espectro FT-IR de la AMP [30].

En ambos espectros se observan cerca de 3300 cm⁻¹ los picos característicos del grupo amino (N-H), en el rango de los 1700-1790 cm⁻¹ se presentan las vibraciones correspondientes al grupo carbonilo (C=O) y en el rango de los 1300-1400 cm⁻¹ se observa el pico correspondiente al grupo ciano (C-N).

En la Figura 9 se presenta el espectro FT-IR del EGDMA, el cual fue utilizado como monómero entrecruzante.

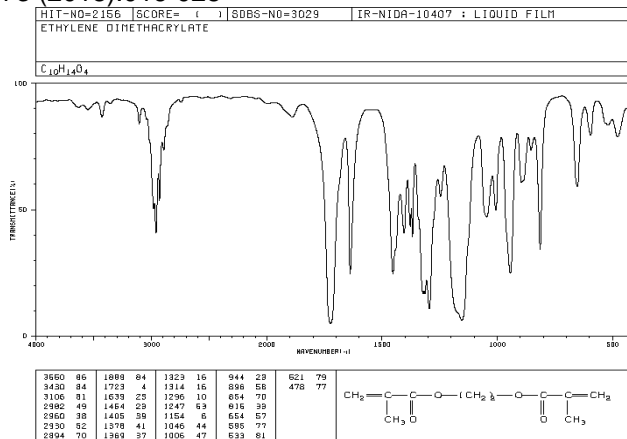


Figura 9: Espectro FT-IR del EGDMA [30].

Es este espectro se observan a 3000 cm⁻¹, el pico correspondiente al enlace C-H; alrededor de 1700 cm⁻¹ el pico correspondiente al grupo C=O; alrededor de los 1600 cm⁻¹ el pico correspondiente al enlace C=C; entre 1100 y 1200 cm⁻¹ una banda ancha correspondiente al enlace -C-O-C- y en 900 cm⁻¹ se observa el pico correspondiente al -C-H deformado de los alquenos.

En la Figura 10 se presenta el espectro FT-IR del MAA. En este espectro se observa en 3000 cm⁻¹ una banda ancha correspondiente a la vibración de la banda del grupo -OH del ácido carboxílico (COOH), en 1690 cm⁻¹ se presenta la señal característica del grupo C=O y en 1637 cm⁻¹, la señal correspondiente al grupo C=C; en 949 cm⁻¹ se observa la banda de flexión del COH (COOH).

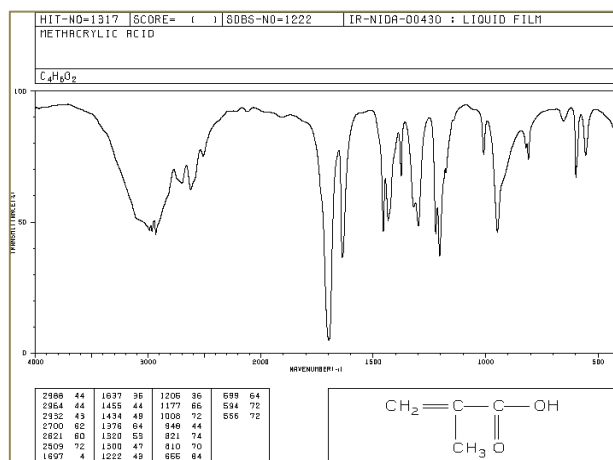


Figura 10: Espectro FT-IR MAA [30]

En la Figura 11 se presenta el espectro FT-IR del MMA. Se observa en el espectro en 1690 cm⁻¹ el pico correspondiente al grupo C=O, en 1637 cm⁻¹ el pico del C=C, y en 3000 cm⁻¹ un pico correspondiente a los enlaces C-H.

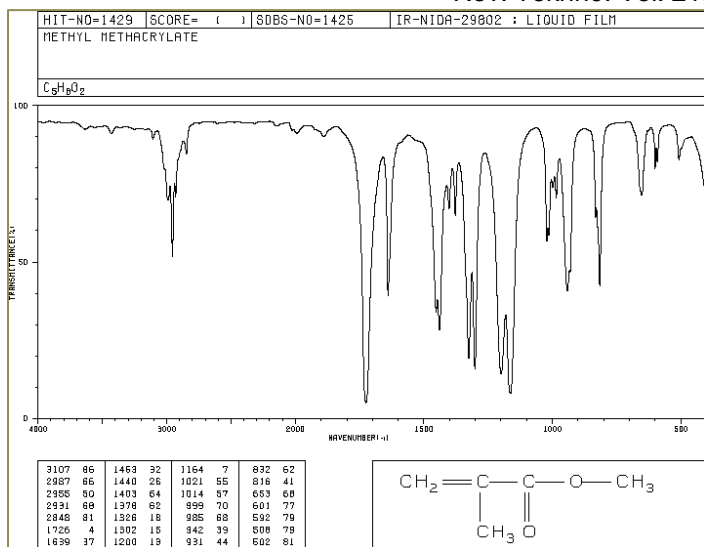


Figura 11: Espectro FT-IR del MMA [30]

1.1 Análisis de los espectros NIR de los polímeros sintetizados:

El análisis de los diferentes espectros NIR se hizo por grupos de polímeros.

Las longitudes de onda se expresan en nm y no en cm-1, ya que se está hablando del infrarrojo cercano.

Es de hacer notar que tanto en los MIPs como en los NIPs estudiados se presenta una banda ancha fuerte en 1900 nm de OH propias del agua.

Los picos correspondientes al C=C en 1600 nm, se observan disminuidos, al igual que los picos correspondientes al C=O en 1700 nm, lo que evidencia el entrecruzamiento en la molécula del MIP.

En la Figura 12 se presentan los espectros NIR de los MIPs 1, 2 y 3 lavados.

1. Comparación entre los espectros NIR y FT-IR de los polímeros sintetizados:

En este grupo de polímeros se cambió el monómero funcional, el MIP 1 fue preparado utilizando MMA, en el MIP 3 el monómero funcional fue el MAA y en el MIP 2 se utilizó la mezcla de ambos monómeros.

A continuación se presentan los espectros NIR y FT-IR de los diferentes polímeros sintetizados.

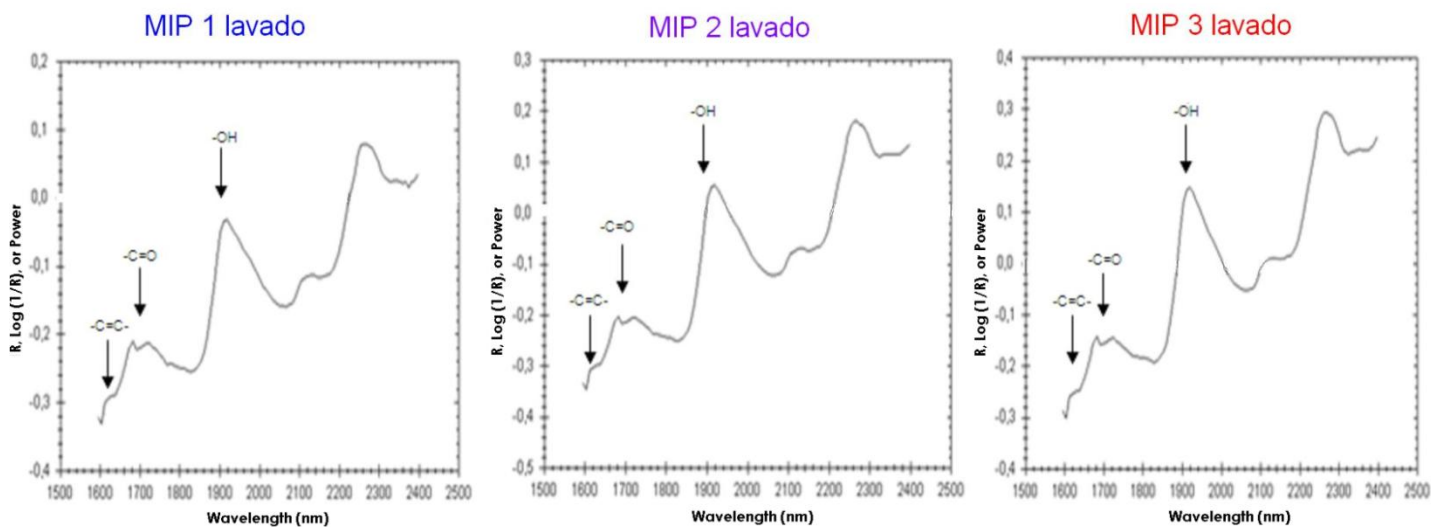


Figura 12: Espectros NIR de los MIPs 1, 2 y 3 lavados

En los tres polímeros se observa una banda ancha fuerte en 1900 nm, de OH propias del agua, y se observan disminuidos los picos correspondientes al -C=C- en 1600 nm, cuando se comparan los espectros con los monómeros funcionales.

En la Figura 13 se presentan los espectros NIR de los polímeros MIP 3, MIP 4, MIP 5 y MIP 6 lavados, en los cuales se mantuvo el monómero funcional (MAA) y se varió la proporción del monómero entrecruzante (EGDMA).

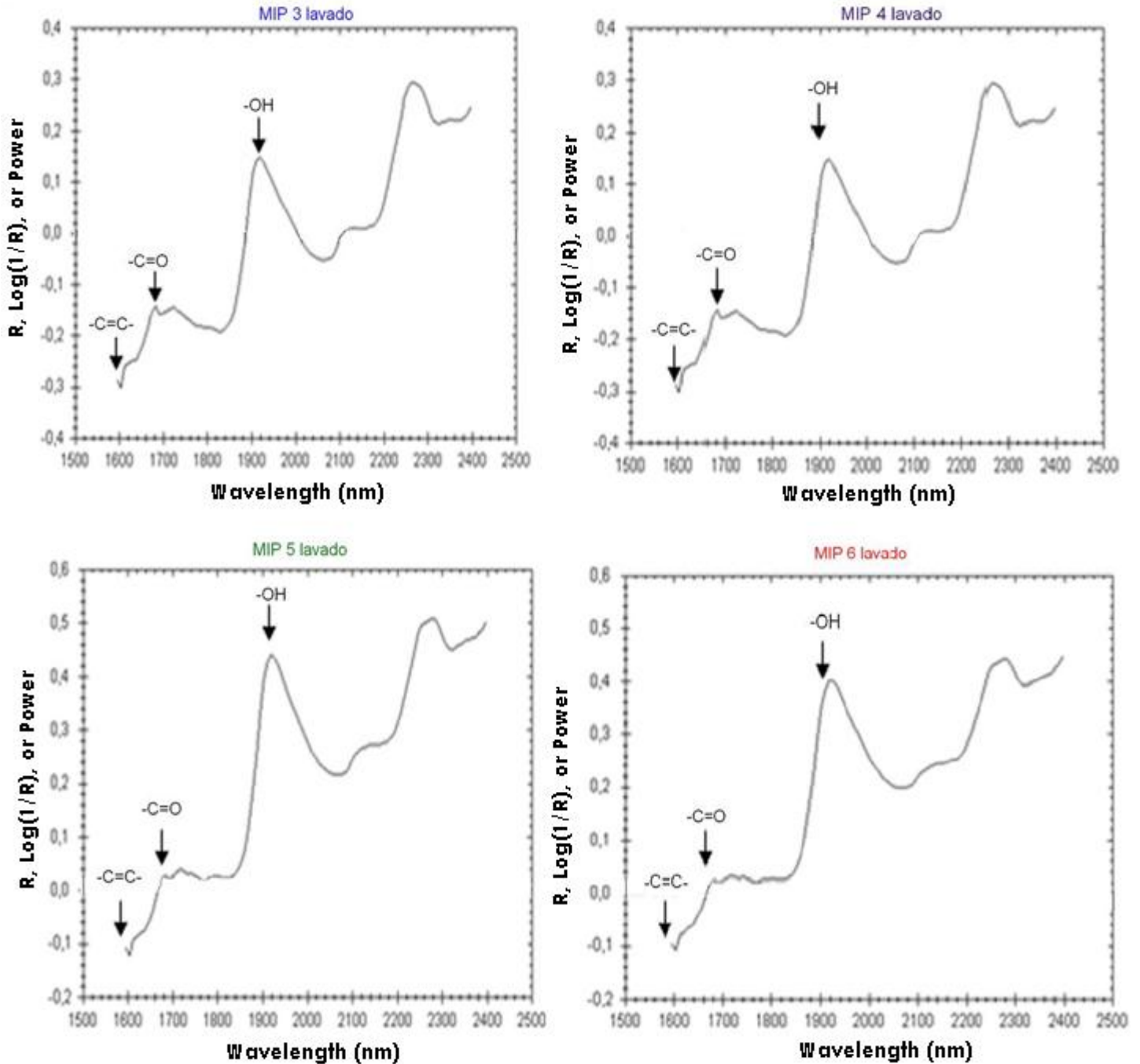


Figura 13: Espectros NIR de los MIPs 3, 4, 5 y 6 lavados

En todos los polímeros se observa una banda ancha fuerte en 1900 nm propia del agua y se presentan muy disminuidos los picos correspondientes al $-C=C-$ en 1600 nm.

En la Figura 14 se presentan los espectros NIR de la AMP, MIP 3 sin lavar, MIP 3 lavado, y NIP 3. En ellos se observa que tanto el polímero no impreso (NIP) como el impreso (MIP) son similares, lo que indica la similitud en la red. En el espectro NIR de los polímeros sintetizados, los

picos correspondientes al $C=C$ en 1600 nm, se observan disminuidos, al igual que los picos correspondientes al $C=O$ en 1700 nm, indicando el entrecruzamiento en los polímeros; por otra parte la banda ancha fuerte del OH en 1900 nm, propia del agua. También se observa la mayor similitud existente entre el espectro de la molécula molde y el precursor (MIP sin lavar). Después del lavado, los espectros se hacen comparables con el NIP (polímero blanco), lo cual indica que toda la molécula molde fue removida del precursor (MIP sin lavar).

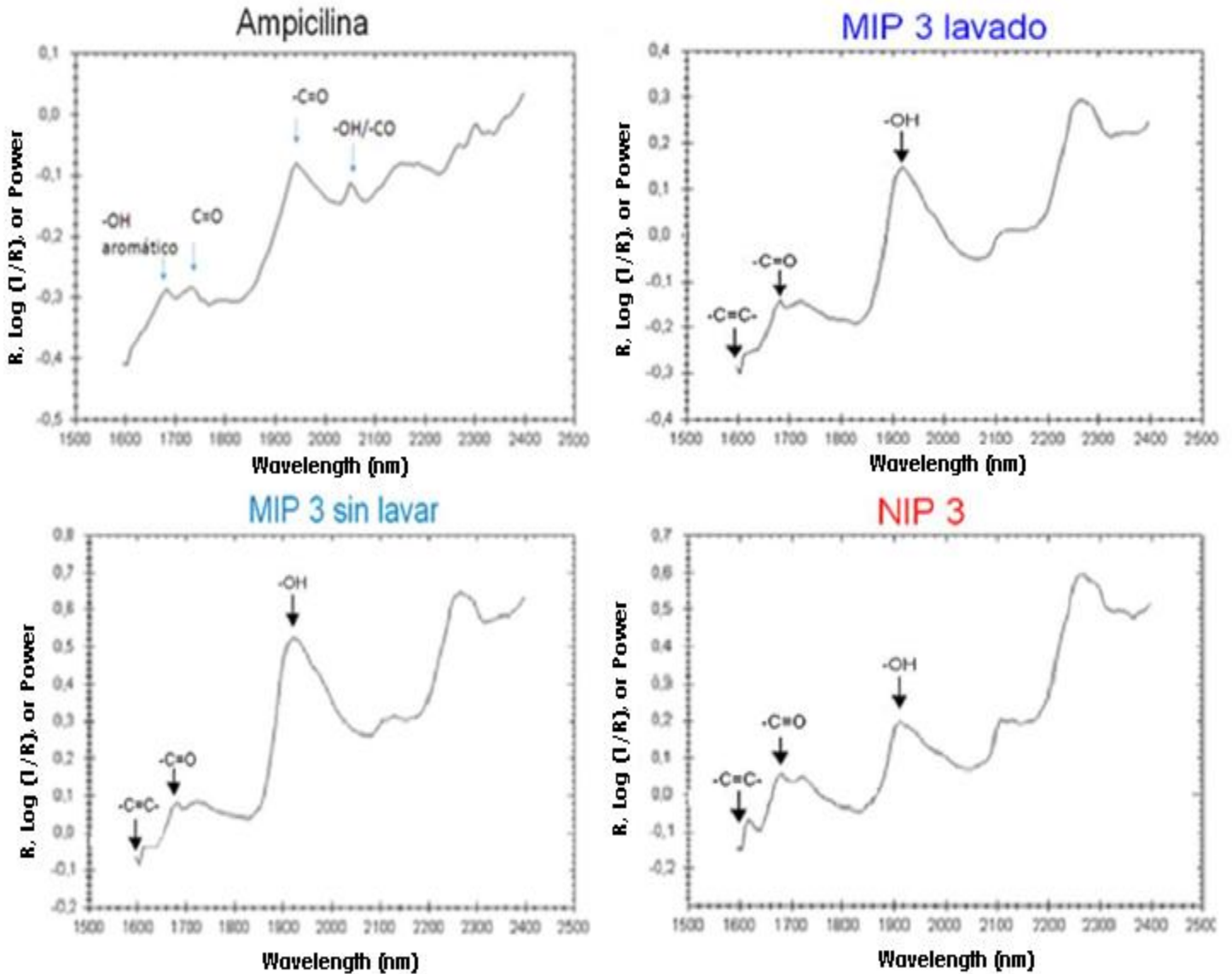


Figura 14: Espectros NIR de la AMP, MIP 3 sin lavar, MIP 3 lavado, NIP 3

1.2 Análisis de los espectros FT-IR de los polímeros sintetizados:

Los espectros FT-IR de los MIP sintetizados y los NIP se registraron en el intervalo de 500-4000 cm⁻¹ por el método de gránulos de KBr.

La Figura 15 muestra los espectros FT-IR de los Polímeros 1, 2 y 3 después de retirar la plantilla (lavado con MIP). Los tres polímeros muestran una banda ancha entre 1100 y 1200 cm⁻¹, correspondiente a las vibraciones de

estiramiento de -C-O-C- que podrían atribuirse al enlace del monómero y el reticulador EGDMA. El pico agudo a 1730 cm⁻¹ es el pico característico del estiramiento C = O, debido a la vibración C = O de EGDMA. El pico ancho en el intervalo de 3300 - 3700 cm⁻¹ se relacionó con las vibraciones de estiramiento de OH. El MIP 3 muestra una banda ancha entre 2850 y 2900 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento de C-H (presencia de COOH). Esta banda disminuye en MIP1 y MIP2 según disminuye la cantidad de MAA, siendo más baja en el MIP1, sintetizado sólo con MMA. Como el MIP 3 se sintetizó sólo con MAA como monómero funcional, el grupo COOH es evidente.

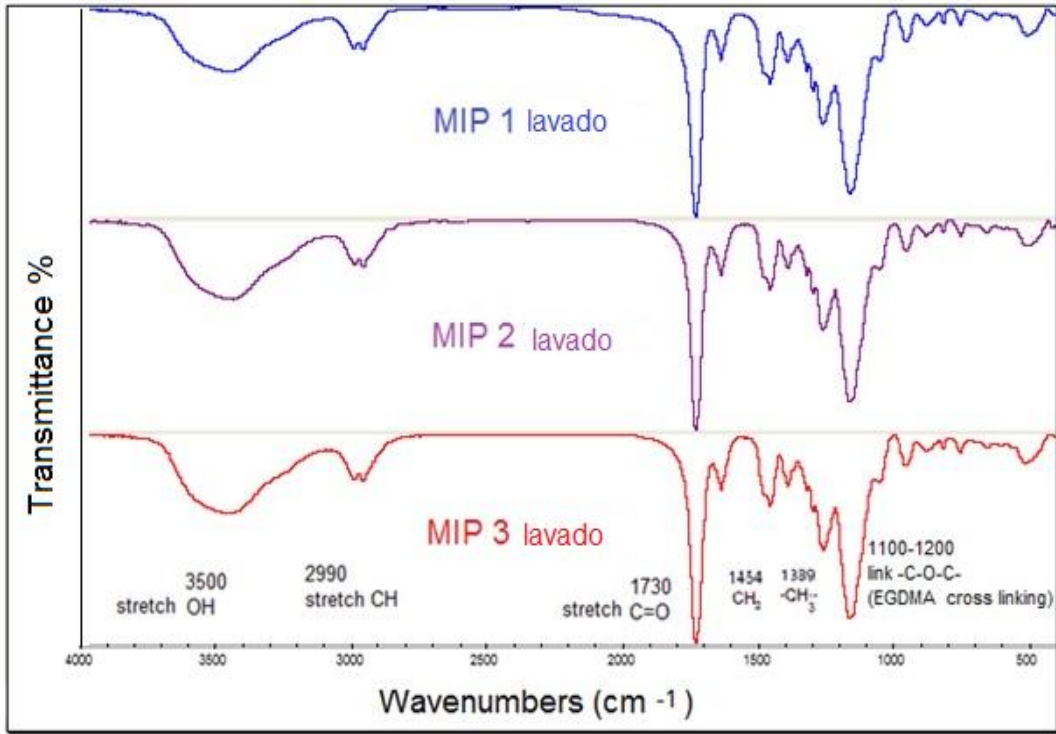


Figura 15. Comparación entre los espectros FT-IR de los MIPs sintetizados usando diferente monómeros funcionales (MIP1: MMA, MIP2: MAA/MMA, 1:1, MIP 3: MAA) después de la remoción de la molécula molde.

El espectro FT-IR representado en la Figura 16 muestra la comparación de los MIPs que contienen diferentes relaciones de reticulante: monómero (MIP 3-6). El perfil del espectro fue similar para todos los polímeros.

Sin embargo, se observó que la proporción de reticulante disminuye, cuando hay una señal creciente de la banda correspondiente a CH (COOH) a 3000 cm⁻¹.

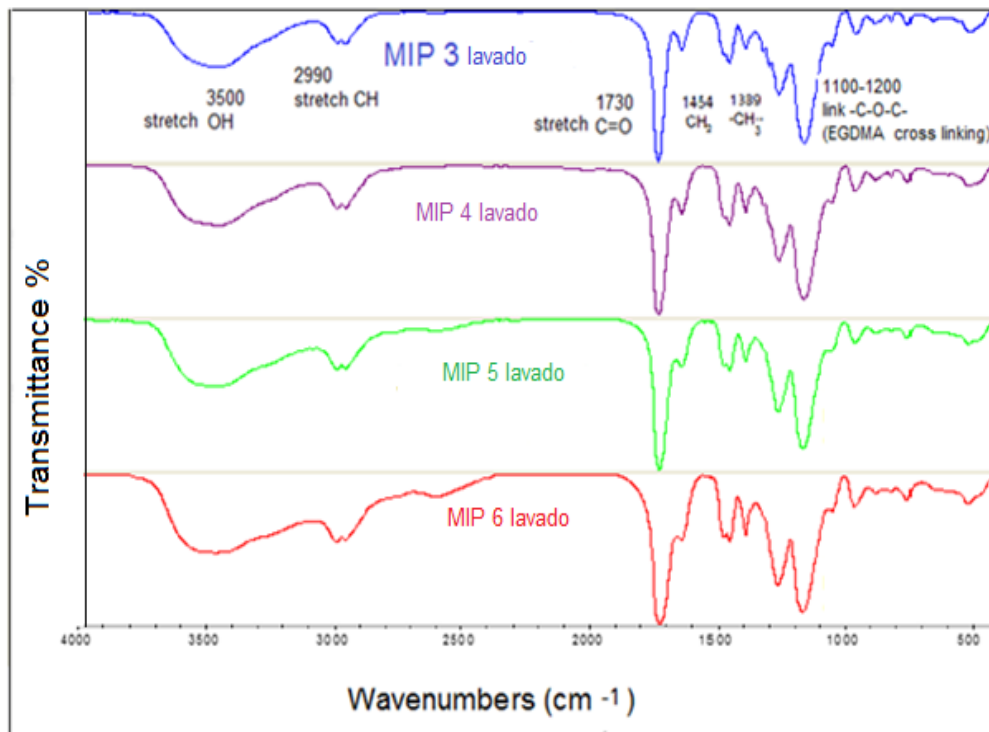


Figura 16. Comparación de los espectros FT-IR de los MIPs sintetizados usando diferentes relaciones monómeros funcionales: entrecruzante, después de remover la molécula molde.

La Figura 17 muestra los espectros FT-IR de la AMP, MIP 3 después y antes de la eliminación de la plantilla (lavada y no lavada, respectivamente) y NIP3. Se puede ver que el espectro de los MIPs y NIP son similares, lo que indica similitud en la estructura de la red. En el espectro IR, hay absorciones debidas al estiramiento OH de carbonilo (3500 cm^{-1}), estiramiento del grupo carbonilo (1730 cm^{-1}), estiramiento CO (1260 cm^{-1}) y vibración CH (756, 1390, 1460 y 2956 cm^{-1}). En 2990 y 2956 cm^{-1} , las vibraciones de estiramiento de la banda CH a 1454 cm^{-1} parecen ser debidas a $-\text{CH}_2-$, y la banda en 1389 cm^{-1} puede deberse a CH_3 . Asimismo, se identificaron también semejanzas entre el espectro de plantilla y MIP 3 sin lavar principalmente en los enlaces CH y CC (500-1600 cm^{-1}). Después del lavado, los espectros del MIP son comparables con el NIP (polímero blanco), lo que indica que toda la plantilla se retiró del MIP sin lavar. Esta similitud se encontró en todos los polímeros evaluados. Todas las señales sugieren que AMP-MIPs fueron sintetizados con éxito. Resultados

similares fueron obtenidos por Santos y colaboradores [33], encontrando que el espectro de IR de MIP sin lixiviación era muy similar al del MIP lixiviado, lo que indica similitud de estructura molecular. En los polímeros impresos molecularmente para el reconocimiento selectivo de 4-aminofenol, [34], los investigadores también encontraron que existe similitud tanto en los espectros de plantilla como en el precursor, en un MIP preparado usando Boc-L-Phe-OH como molde. Después del lavado, el espectro del MIP se hace comparable al del polímero utilizado como blanco, y en MIPs sintetizados a base de 1-vinil-2-pirrolidona como monómero y divinilbenceno como reticulante [35], se encontró en general que los espectros FT-IR para todos los MIPs son muy similares entre sí, consistente con el hecho de que todos los productos fueron sintetizados basados en el mismo monómero y reticulante y tampoco hubo diferencia significativa entre MIPs y NIPs.

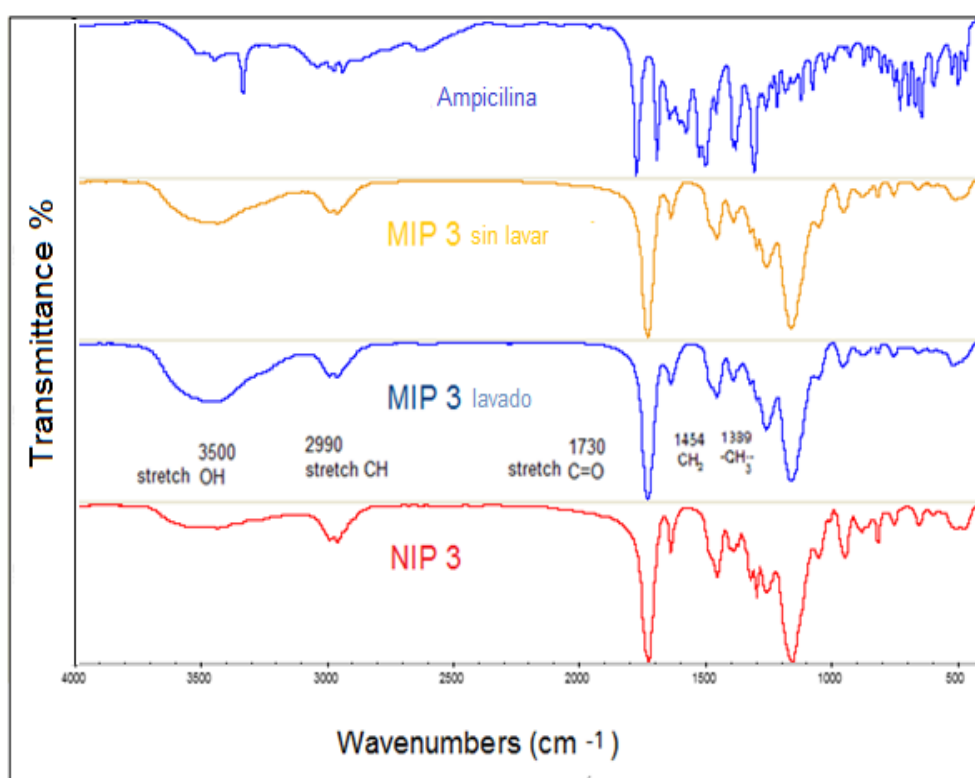


Figura 17: Espectro FT-IR de la AMP, MIP 3 después y antes de la remoción de la molécula molde (lavada y sin lavar, respectivamente) y NIP 3

Es importante señalar que el MIP desarrollado utilizando MAA como monómero funcional (MIP 3) mostró mayor afinidad a la AMP que el polímero desarrollado utilizando MMA o la mezcla de MMA y MAA cuando se evaluaron los polímeros por el método MISPE [12].

V. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se concluye:

En los espectros NIR obtenidos se observa la disminución de los picos correspondientes al $-\text{C}=\text{C}-$, y la presencia del pico correspondiente al $-\text{C}=\text{O}-$ presente en la molécula del monómero entrecruzante, evidenciando esto el entrecruzamiento en el polímero. Lo anterior también se observa en los espectros FT-IR.

Se observa en los espectros NIR y en los espectros FT-IR, que tanto el polímero control No Impreso (NIP) como el

Polímero Impreso (MIP) presentan similitud en sus formas, lo que indica la semejanza en la estructura de la red.

Igualmente, se aprecia la mayor similitud existente entre los espectros NIR y FT-IR tanto de la molécula molde como del precursor (MIP sin lavar). Después del lavado, los espectros del MIP se hacen comparables con el NIP (polímero blanco), lo cual indica que toda la molécula molde fue removida del precursor (MIP sin lavar).

Los resultados anteriormente presentados indican que es posible emplear los espectros NIR para caracterizar un MIP, por medio del análisis de los grupos funcionales.

VI. AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Dr. José Enrique Sun Han de la empresa Corporación Científica Venezolana C. A., en

Caracas, Venezuela, por el uso del equipo Polychromix, para la realización de los espectros NIR.

REFERENCIAS

- [1] Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M. y Tordecilla, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Revista Salud Pública*. Volumen 11, nº 4. Pág. 570-590. Recuperado de: <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v11n4/v11n4a09.pdf> [Consulta: 2011, Abril 18].
- [2] Zwald, A., Ruegg, P., Kaneene, J., Warnick, L., Wells, S., Fossler, C. y Halbert, L. 2004. Management Practices and Reported Antimicrobial Usage on Conventional and Organic Dairy Farms. American Dairy Science Association. *Journal of Dairy Science*. 87 pp: 191-201
- [3] Sawant, A.; Sordillo, L. y Jayarao, B. 2005. A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*. 88 pp. 2991-2999.
- [4] Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. (1990). Evaluación de ciertos residuos de fármacos de uso veterinario en los alimentos. 36º Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Organización Mundial de la Salud. Serie de informes técnicos; 799. Ginebra, Suiza. Recuperado de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40417/1/WHO_TRS_799_spa.pdf [Consulta: 2014, Agosto 16].
- [5] Gesche, E., y Emilfork, C. (1998). Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. *Archivos de medicina veterinaria*, 30 (2), 137-143. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X1998000200014> Recuperado de: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X1998000200014&script=sci_arttext [Consulta: 2016, Julio 10].
- [6] Quizhpe, A., Encalada, L., Sacoto, A., Andrade, D., Muñoz, G., Calvo, D., Lara, M., Guevara, A., Abadía, L., Murray, M., y Sivaraman, S. (2014). Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana. *ReAct. Latinoamérica*. Cuenca – Ecuador.
- [7] Aguayo, S. (2012). Repercusión sanitaria en el medio ambiente del consumo de antibióticos. *Revista Seguridad y Medio Ambiente*. Nº 127. Tercer trimestre. pp 34-43. Recuperado de: <http://www.mapfre.com/fundacion/html/revistas/seguiridad/n127/docs/Articulo3.pdf> [Consulta: 2014, Agosto 18].
- [8] Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Martí, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsio, Á., Borrego, C., Barceló, D y Balcázar, J. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, pp. 234–242.
- [9] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2002). Parte I: Aditivos distintos de los microorganismos y las enzimas. *Boletín Oficial del Estado*. Nº 40. Pág. 6096-6109. Madrid, España. Recuperado de: <http://www.agrodigital.com/upload/2/20/orden%20apa%202732002%20sobre%20lineas%20para%20la%20evaluacion%20de%20aditivos%20en%20alimentacio%20animal.pdf> [Consulta: 2014, Octubre 11].
- [10] Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los Límites Máximos de Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (DOCE L224/1990).
- [11] Benito, M. (2006). Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en nuevos elementos de reconocimiento molecular para la determinación de antibióticos β -lactámicos en muestras de interés agroalimentario y medioambiental. (Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica, Madrid, España). Recuperado de: <http://eprints.ucm.es/tesis/qui/ucm-t29424.pdf> [Consulta: 2011, Abril 15].
- [12] Soledad-Rodríguez, B., Fernández-Hernando, P., Garcinuño-Martínez, R., Durand-Alegría, J. (2017). Effective determination of ampicillin in cow milk using a molecularly imprinted polymer as sorbent for sample preconcentration. *Food Chemistry*. 224, 1:432–438
- [13] Cheremisinoff, N. *Polymer characterization: laboratory techniques and analysis*. Noyes Publications, USA. 1996.
- [14] Painter, P., Coleman, M., Irvin, J., Fernandez-Berridi, M. *Fundamentals de ciencia de polímeros: un texto introductorio*. CRC Press. 1996.
- [15] Campbell, D. Pethrick, R., White, J. *Polymer characterization: physical techniques*. Stanley Thornes, Ltd. United Kingdom. 2000.
- [16] Seymour, R. y Carraher, C. *Introducción a la química de los polímeros*. Editorial Reverté, S.A. España. 2002.
- [17] Allinger, M. P., Cava, D. C., De Jong, C. R., Johnson, N. A., Lavel, N., Stevens, C. *Organic Chemistry*. Segunda Edición. Editorial Reverté, S.A. España, 1984.
- [18] Morrison, R. y Boyd, R. *Química Orgánica*. Quinta edición. Addison Wesley Longman de México S.A. de CV. 1998.
- [19] Santos, W., Lima, P., Tarley, C., Kubota, L. 2009. Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminophenol. *J. Braz. Chem. Soc.* vol.20, n.5. pp. 820-825
- [20] Zakaria, N., Yusof, N., Haron, J., Abdullah, A. 2009. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for 2, 4-dinitrophenol. *Int. J. Mol. Sci.* 10, pp 354-365.
- [21] Rong, F., Feng, X., L., P., Yuan, C., Fu, D. 2006. Preparation of molecularly imprinted microspheres by photo-grafting on supports modified with iniferter. *Chinese Science Bulletin*. Vol. 51 No. 21 2566—2571.
- [22] Songjun Li, Xing Huang, Mingxia Zheng, Wuke Li, Kejun Tong. 2008. Molecularly Imprinted Polymers: Thermodynamic and Kinetic Considerations on the Specific Sorption and Molecular Recognition. *Sensors*. 8. 2854-2864
- [23] Philip, J., Buchweishaija, J., Mkyula, L., Ye, L. 2007. Preparation of Molecularly Imprinted Polymers Using Anacardic Acid Monomers Derived from Cashew Nut Shell Liquid. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (22), pp 8870–8876
- [24] Liu, Z., Bucknall, D., Allen, M. 2010. Absorption performance of iodixanol-imprinted polymers in aqueous and blood plasma media. *Acta Biomaterialia*. 6. 2003–2012.
- [25] Urban, J., Eeltink, S., Jandera, P y Schoenmakers, P (2008). Characterization of polymer-based monolithic capillary columns by inverse size-exclusion chromatography and mercury-intrusion porosimetry. *Journal of Chromatography A* 1182(2):161-8
- [26] Hilal, N., Kochkodan, V., Al-Khatib, L y Busca, G. (2002) Characterization of molecularly imprinted composite membranes using an atomic force microscope. *Surface and interface analysis*. 33 (8): 672-675
- [27] Ozaki, Y., McClure, F., Christy, A. *Near Infrared spectroscopy in food science and technology*. Wiley-Interscience. 2007.
- [28] Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S., de la Pezuela, C. 1998. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *Analyst*. Vol. 123 (135R–150R)
- [29] United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 30-NF 25) (2007). Vol 2. Rockville, MD. United States Pharmacopeia Convention. p 1410.
- [30] Luner, P., Majuru, S., Seyer, J., y Kemper, M. (2000). Quantifying Crystalline Form Composition in Binary Powder Mixtures Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Pharmaceutical Development & Technology*, 5(2), 231.
- [31] Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. Lippincott Williams & Wilkins, 21 Edición. (2006) USA.
- [32] Spectral Database for Organic Compounds. SBDS. http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng
- [33] Santos, W., Lima, P., Tarley, C., Kubota, L. (2009) Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminophenol. *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (5): 820-825
- [34] Li, S.; Huang, X.; Zheng, M.; Li, W, y Tong, K. (2008). Molecularly Imprinted Polymers: Thermodynamic and Kinetic Considerations on the Specific Sorption and Molecular Recognition. *Sensors*, 8: 2854-2864
- [35] Pereira, E., Cáceres, C., Rivera, F., Rivas, B., y Sáez, P. (2014). Preparation of molecularly imprinted polymers for diphenylamine removal from organic gunshot residues. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 59 (4): 2731-2736.