



RECONOCIMIENTO MOLECULAR EN MACROMOLÉCULAS SINTÉTICAS

INÉS ORELLANA RUIZ



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
CURSO 2015-2016



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

RECONOCIMIENTO MOLECULAR EN MACROMOLÉCULAS SINTÉTICAS

Inés Orellana Ruiz

Sevilla, 20 de septiembre de 2016

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Tutores: Doña Inmaculada Molina Pinilla y Don Manuel Bueno Martínez

Carácter bibliográfico

RESUMEN

El reconocimiento molecular constituye actualmente una de las ramas de estudio más prometedora, fruto de la combinación de las ciencias químicas y biológicas. Este concepto está involucrado en numerosos procesos biológicos que se dan en la naturaleza y que, al contrario de lo que se cree, raramente ocurren al azar, sino que a menudo ocurren entre moléculas seleccionadas, sobretodo en sistemas altamente organizados, lo que implica asociaciones intermoleculares más o menos complejas que pueden ser vistas como el sistema de comunicación molecular del mundo químico. La creación de macromoléculas sintéticas capaces de realizar reconocimiento molecular ha aumentado espectacularmente en los últimos años. Estos compuestos tienen aplicación en el análisis clínico, medioambiental y agroalimentario. En el campo farmacéutico abre un amplio abanico de posibilidades a la hora de diseñar nuevas terapias. De los métodos de obtención de macromoléculas sintéticas capaces de reconocimiento molecular, en este trabajo de fin de grado, se ha elegido la impresión molecular por su bajo coste, resistencia, versatilidad, alta selectividad y sencillez de preparación. En esta revisión se pretende dar una visión general de cómo se efectúa el reconocimiento molecular y de las interacciones no covalentes que lo hacen posible, y, además, explicar uno de los métodos más importante de obtención de macromoléculas sintéticas, la impresión molecular. Se hace un repaso de las ventajas con respecto a los receptores biológicos y las limitaciones de los polímeros impresos molecularmente. Las cuatro formas de impresión molecular que revisamos pueden optimizarse en aspectos como los monómeros funcionales, agentes de entrecruzamiento, disolvente porógeno e iniciador. Dedicamos, por ello, un último apartado a los nuevos enfoques para la optimización.

ABSTRACT

Molecular recognition is currently one of the most promising study fields, resulting from the combination of the chemical and biological sciences. It is involved in many biological processes that occur in nature. Contrary to popular belief, these processes rarely occur randomly, especially in highly organized systems involving intermolecular associations. These associations, more or less complex, can be seen as the molecular communication system of the chemical world. The creation of synthetic macromolecules capable of molecular recognition has increased dramatically in recent years. These compounds have applications in the clinical, environmental and food analysis. In the pharmaceutical world, they open up a wide range of possibilities when designing new therapies. Of the methods existing to obtain

synthetic macromolecules capable of molecular recognition, Molecular Imprinting was chosen for its low cost, strength, versatility, high selectivity and ease of preparation. This review aims to give an overview on how the molecular recognition is made and of the non-covalent interactions that make it possible as well as explain one of the most important methods of obtaining synthetic macromolecules, molecular printing. A review of the advantages against biological receptors and the limitations of molecularly imprinted polymers is made. Four forms of molecular impression are reviewed, and these can be optimised in aspects such as functional monomers, crosslinking agents, pore-forming solvent and initiator. This is addressed in the last chapter of this work.

PALABRAS CLAVE

Molecular recognition, macromolecules, synthetic polymers, antibody, molecular imprinting.

ÍNDICE

1. Introducción	6
2. Objetivos	8
3. Metodología	8
4. Resultados y Discusión	8
4.1. Reconocimiento Molecular: Química Supramolecular	8
4.2. Interacciones No Covalentes	10
4.2.2. Enlace de hidrógeno.	12
4.2.3. Interacciones π - π	13
4.2.4. Interacciones de Van der Waals y dispersión de London	15
4.2.5. Efecto hidrofóbico.....	17
4.3. Macromoléculas Sintéticas empleadas en el Reconocimiento Molecular.....	18
4.3.1. Polímeros de Impresión Molecular (MIPs).....	19
4.3.2. Métodos de obtención de los MIPs	20
4.3.2.1. Método de impronta covalente	20
4.3.2.2. Método de impronta no covalente	22
4.3.2.3. Método semi-covalente	23
4.3.2.4. Método de impronta mediante “espaciadores sacrificables”	24
4.3.3. Optimización a nivel sintético de los MIPs en el Reconocimiento.....	26
4.3.3.1. Monómeros funcionales	27
4.3.3.2. Agente de entrecruzamiento	29
4.3.3.3. Disolvente porógeno	31
4.3.3.4. Iniciador.....	31
4.4. Nuevos Métodos	32
5. Conclusiones.....	33
6. Bibliografía	34

1. INTRODUCCIÓN

El Reconocimiento Molecular es el proceso por el que un receptor reconoce e identifica una especie química a través de un conjunto de interacciones moleculares estructuralmente muy bien definidas (Fernández-González y Guardia, 2007). Este proceso se da en la naturaleza de forma espontánea y es el punto de partida de numerosos procesos biológicos tales como los neurotransmisores, las hormonas, los sistemas enzima-sustrato y antígeno-anticuerpo, los mecanismos de acción de los fármacos, entre otros.

La especificidad del reconocimiento molecular (host-guest) se basa en la complementariedad estructural y funcional de una parte de las moléculas que participan en el equilibrio de interacción. Son las interacciones no covalentes las que juegan un papel fundamental en este proceso de reconocimiento molecular, y generalmente, no es un único tipo de interacción intermolecular por sí misma la que impulsa la unión receptor-ligando, sino que es la acción cooperativa de múltiples de estas interacciones. La cooperatividad es un concepto fundamental, no solo en el reconocimiento molecular sino también en los auto-ensamblajes supramoleculares, es decir en la asociación espontánea de pequeñas entidades, para formar agregados estables y perfectamente estructurados, como son las proteínas globulares. La cooperatividad ha permitido explicar cómo el comportamiento de un sistema de interacciones en conjunto, es diferente de lo que se esperaría de cada una de las interacciones individuales aisladas (Carrillo y cols., 2011). Cuanto más complementarios sean los lugares receptor-ligando, mayor es su energía de unión, lo que lo convierte en un fenómeno fundamental en el desarrollo y la regulación de las propiedades colectivas en los complejos químicos y en los sistemas biológicos.

Un conocimiento estructural a nivel atómico de esta complementariedad molecular en los procesos de reconocimiento molecular en disolución, permite aportar nuevas soluciones optimizadas en forma de modificaciones químicas, con el objetivo de incrementar o disminuir las afinidades entre las moléculas participantes, creando así el entorno adecuado para el diseño racional de nuevos ligandos. El objetivo o reto, es la posibilidad de desarrollar compuestos sintéticos capaces de presentar una funcionalidad equiparable a los de la naturaleza, siendo de gran interés para uso médico y farmacéutico. Es por ello que, en el campo de la investigación química actual, un objetivo de gran interés es el diseño, preparación y caracterización de receptores sintéticos capaces de imitar los procesos de reconocimiento molecular llevados a cabo por macromoléculas biológicas como las enzimas, debido a su elevado potencial de desarrollo en aplicaciones como en el análisis de compuestos de importancia clínica y ambiental y preparación de sensores (Mahon y Fulton, 2014). La química

supramolecular estudia los sistemas que implican la unión de moléculas o iones mediante interacciones no covalentes: interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno o interacciones por formación de dipolos (Steed y cols., 2007). Para ello emplea la *Impresión Molecular*, una estrategia que permite crear matrices poliméricas artificiales con sitios de unión selectivos que presentan propiedades de reconocimiento molecular específico con una distribución de grupos funcionales adecuada para enlazar al sustrato que se desea. Presentan una gran afinidad, así como una selectividad, similar a muchos receptores naturales, pudiéndose regenerar fácilmente. Son fáciles de fabricar y se pueden producir en grandes cantidades debido al bajo coste de los reactivos necesarios para su preparación (Figura 1).

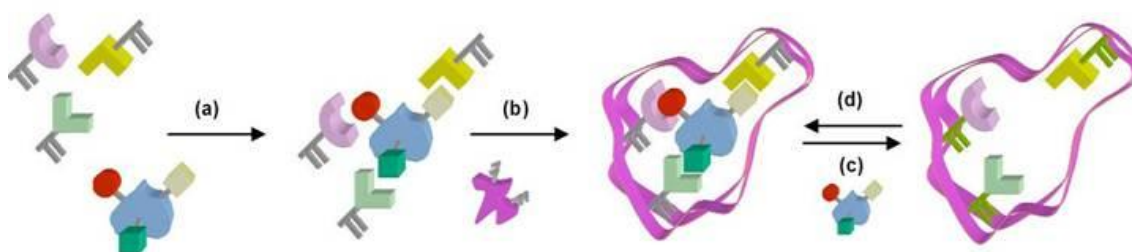


Figura 1.- Representación del proceso de obtención de polímeros de impresión molecular (MIPs); (a) Formación del complejo de prepolimerización entre la molécula molde y los monómeros funcionalizados. (b) Co-polimerización con el agente de entrecruzamiento. (c) Extracción de la plantilla de la cavidad. (d) Unión de la plantilla a la cavidad.

El empleo de MIPs (“molecular imprinted polymers”) presenta una serie de ventajas frente a biomoléculas como son los anticuerpos, los ácidos nucleicos, las enzimas, etc., como es la posibilidad de trabajar en condiciones extremas de pH, o temperatura, así como en presencia de disolventes orgánicos, no viéndose afectado por ello ni su estructura ni su afinidad por el sustrato. Sin embargo, presentan problemas de contaminación al no poderse eliminar completamente las moléculas molde. Los MIPs se están empleando ampliamente en campos como la biología y en medioambiente. (Tamayo y cols., 2007; Pichon, 2007; Stevenson, 1999).

2. OBJETIVOS

En esta revisión se han marcado los siguientes objetivos:

- Proporcionar una visión general del concepto “reconocimiento molecular”.
- Mostrar la relación existente entre el reconocimiento molecular y las macromoléculas sintéticas.
- Exponer cómo se diseñan y sintetizan dichas macromoléculas mediante impresión molecular.
- Indicar los avances más recientes en su preparación en el reconocimiento molecular, que podrían ser de interés.

3. METODOLOGÍA

Este trabajo de fin de grado perteneciente al campo de la Química Orgánica y Farmacéutica, con pinceladas de otros como la Tecnología Farmacéutica y la Biotecnología, tiene un carácter bibliográfico. La metodología ha consistido en la recopilación de información, empleando recursos electrónicos como las bases de datos científicas PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Scopus (<http://www.scopus.com/>) y Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>), además de los Recursos-e de la Biblioteca de la Universidad de Sevilla (http://bib.us.es/busca_y_encuentra/recursos_e). Como palabras clave en la búsqueda se emplearon: molecular, recognition, macromolecules, synthetics, polymers, antibody, dendrimers, molecular imprinting. Para que esta búsqueda quedara dirigida al tema deseado, se combinaron “molecular” y “recognition” con las otras palabras clave en todas las búsquedas.

De los artículos y revisiones encontrados se seleccionaron los más recientes, fundamentalmente de 2010 en adelante, y los de mejor índice de impacto. Al proceder a la consulta de estas fuentes, todas en inglés, se presenta el obstáculo del empleo de un lenguaje técnico que se resuelve conforme se avanza en el conocimiento de la materia.

A la hora de elaborar el contenido se contó con la orientación y seguimiento de los profesores tutores a través de entrevistas personales y consultas vía email, acordando planes de trabajo marcados.

En la confección del trabajo se siguieron las directrices del documento “Especificaciones formales memoria Trabajo Fin de Grado” de la Facultad de Farmacia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Reconocimiento Molecular: Química Supramolecular

Es la química de enlaces covalentes a la que se le ha prestado mayor atención durante décadas ya que los enlaces covalentes determinan la disposición de los átomos dentro de una molécula, sin embargo son las interacciones no covalentes, siendo muchos más débiles, las que controlan las propiedades de numerosos procesos biológicos y químicos como el reconocimiento, la catálisis, el transporte, la regulación,..., ya que son las responsables de la conformación de las moléculas o de las agregaciones moleculares. Es por ello que, en los últimos años, el diseño y la síntesis de nuevos receptores moleculares destinados al reconocimiento selectivo de moléculas de importancia biológica y/o química ha sufrido un desarrollo espectacular.

El concepto "Reconocimiento Molecular" (Gellman, 1997) comprende un conjunto de fenómenos basados en interacciones específicas y de naturaleza no covalente. Es un proceso que incluye no sólo el reconocimiento sino también la interacción selectiva entre entidades químicas dentro de un entorno químico complejo, con el objetivo de realizar una función específica (Lehn, 1995). Esta unión selectiva es el resultado de la combinación del ajuste estérico entre el ligando y la cavidad del receptor junto a una distribución espacial apropiada de los lugares de unión entre ambas moléculas, que potenciará las interacciones atractivas y disminuirá las repulsivas. Por lo tanto, en el reconocimiento molecular, la elevada selección por parte del receptor se fundamentará en una gran diferencia en la energía del sistema resultante en la formación del complejo con una molécula determinada frente a otras presentes (Figura 2) (Lehn, 1985).

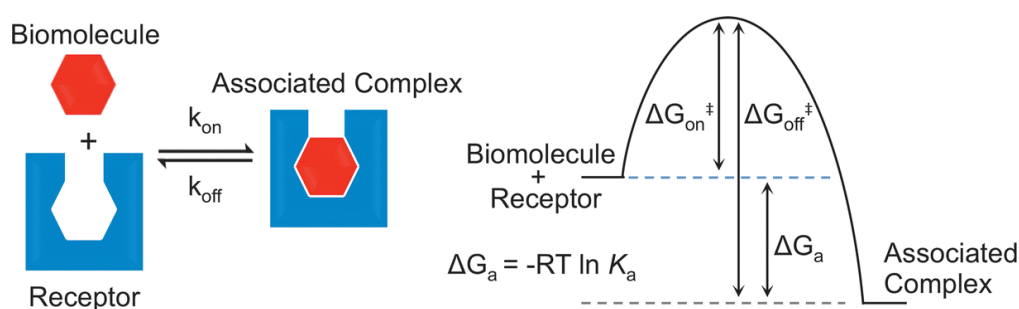


Figura 2.- Diagrama de energía de formación del complejo receptor-ligando: la energía libre de asociación (ΔG_a) determina la constante de asociación (K_a). Las energías libres de activación para la asociación compleja (ΔG_{on}^{\ddagger}) y de la disociación ($\Delta G_{off}^{\ddagger}$), establecen las constantes de velocidad correspondientes para estos pasos (k_{on} y k_{off} , respectivamente).

Sin embargo, para que exista un reconocimiento molecular adecuado, una propiedad imprescindible en todo este proceso es la “complementariedad espacial y química entre el receptor y su sustrato”; es decir, el receptor debe poseer la información sobre la forma, el tamaño así como la naturaleza química del sustrato que le permita reconocerlo entre un conjunto de otras moléculas, y al ejecutar dicha información se desarrolle un conjunto de interacciones químico-físicas de una manera perfectamente establecida y ordenada con el sustrato. Así, por ejemplo, la asociación anticuerpo-antígeno (Amit y cols., 1988) y la estabilización selectiva del estado de transición en las reacciones enzimáticas, (Krant, 1988) son fenómenos de reconocimiento molecular que transcurren dentro de un entorno biológico complejo cumpliendo un propósito concreto. Es por ello que en el diseño y síntesis de nuevos receptores moleculares destinados al reconocimiento selectivo de moléculas se debe contemplar varios factores, que pueden quedar englobados en dos puntos:

1.- *Complementariedad estérica receptor-ligando*; debe existir dominios complementarios en forma y tamaño entre ambas especies.

2.- *Complementariedad química*; debe existir lugares de interacción complementaria, colocados de manera adecuada entre ambas especies, de modo que permitan la presencia de:

- a) Enlaces por puentes de hidrógeno
- b) Atracción electrostática entre centros aniónicos y catiónicos, entre dipolos, o entre dipolos y cargas,
- c) Interacciones de transferencia de carga entre residuos aromáticos del receptor y regiones aromáticas del sustrato.
- d) Atracciones de Van der Waals entre regiones hidrofóbicas de ambas especies.

Así, en los años 60 surge la Química Supramolecular, una rama de la química que fue definida por Jean-Marie Lehn, premio Nobel de Química en 1987, como “La Química más allá de la molécula que estudia las entidades organizadas de alta complejidad que resultan de la asociación de dos o más moléculas mediante enlaces intermoleculares no covalentes” (Lehn, 2002). La Química Supramolecular abarca dos categorías: el *reconocimiento molecular*, cuando una de las moléculas es mucho más grande y puede “envolver” a la otra incluyéndola, como resultado de interacciones intermoleculares no covalentes con un propósito y el *auto-ensamblaje molecular*, cuando se produce una asociación espontánea de un número no definido de componentes que tienen una organización microscópica definida y unas características macroscópicas que dependen de su naturaleza como las micelas, las membranas bicapa o los cristales líquidos (Amabilino y Stoddart, 1993); (Langford y cols., 1995); (Philp y Stoddart, 1996).

4.2.- Interacciones No Covalentes

En una interacción supramolecular, las unidades se unen reversiblemente mediante fuerzas intermoleculares no covalentes (2 y 300 kJ/mol) las cuales son más débiles que un enlace covalente (150–450 kJ/mol) bajo control termodinámico (Tabla 1) (Steed y cols., 2007); sin embargo, la combinación de distintas interacciones intermoleculares puede formar un complejo supramolecular de gran estabilidad.

Algunas de las interacciones no covalentes son bien conocidas como los enlaces de hidrógeno o las interacciones entre iones; por el contrario, las interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, fuerzas de dispersión de London, apilamiento π - π , transferencia de carga y efectos hidrofóbicos están menos concretadas.

Interacción	Fuerza de enlace (kJ/mol)
Ion – ion	200 – 300
Ion – dipolo	50 – 200
Dipolo – dipolo	5 – 50
Enlace de hidrógeno	4 – 120
π – π	0 – 50
Van der Waals	< 5

Tabla 1. Fuerzas de enlace para cada una de las interacciones supramoleculares

4.2.1.- Interacciones Electroestáticas

Las interacciones electroestáticas son consideradas de gran interés a nivel biológico, éstas se basan en la ley de Coulomb, engloban las interacciones ion-ion, ion-dipolo y dipolo-dipolo (Figura 3) y se fundamentan en la atracción entre cargas de signo opuesto.

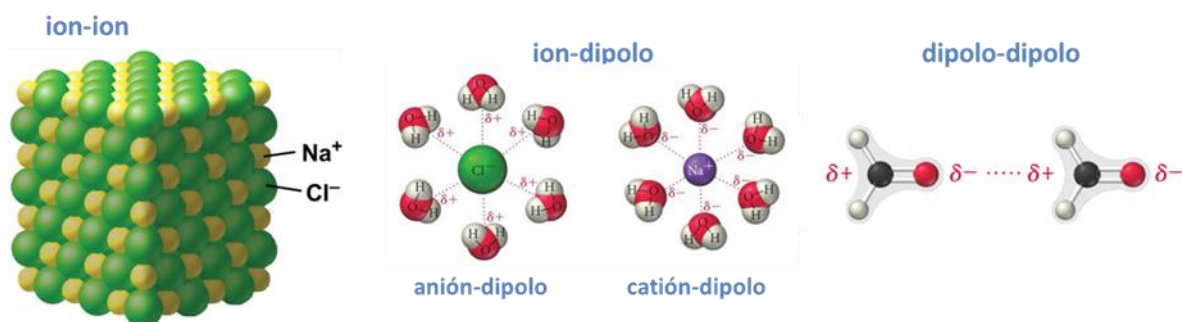


Figura 3.- Representación de los tipos de interacciones electroestáticas.

Las interacciones electrostáticas ion-ion, es la más fuerte de las tres, depende de la distancia entre los grupos, aunque no muestra dependencia de la direccionalidad, por lo que puede tener lugar independientemente de la orientación de las especies participantes. Sin embargo, las interacciones ion-dipolo y dipolo-dipolo son interacciones direccionales, en las que la fuerza de la interacción va a depender de las especies involucradas, de manera que la interacción ion-dipolo es más fuerte debido a que el ion tiene una mayor densidad de carga que el dipolo. Las interacciones direccionales presentan rigidez, lo que conlleva a que sólo moléculas complementarias entre sí puedan agregarse.

Las interacciones electrostáticas son especialmente importantes en sistemas biológicos en los que tienen gran influencia enlaces de gran afinidad, los cuales requieren un reconocimiento que involucra un gran número de interacciones entre moléculas cargadas, como por ejemplo en las interacciones enzima-sustrato.

4.2.2.- Enlace de hidrógeno

Este enlace es una atracción inter o intramolecular que se da entre un átomo electronegativo (A) “aceptor” generalmente oxígeno o nitrógeno y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo (D) electronegativo “donador” (Figura 4).

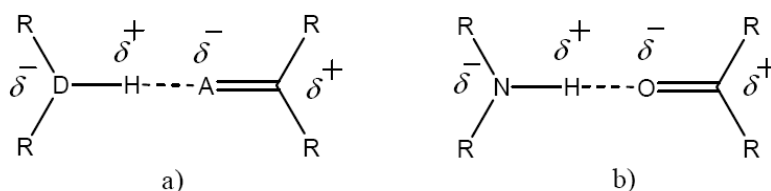


Figura 4.- a) Representación clásica del puente de hidrógeno, b) puente de hidrógeno establecido entre un grupo carbonilo (aceptor) y un grupo amino (donador) (Steed, 2006).

Algunos autores han determinado que es un enlace muy direccional, es decir la energía del enlace de hidrógeno depende del ángulo de enlace (fuerzas de enlace entre 4 y 120 kJ/mol); considerándose que los enlaces de hidrógeno más fuertes son los que presentan geometría lineal (dador-hidrógeno-aceptor) y disminuye cuando se disponen en ángulo. En la Figura 5 se muestran las representaciones de las geometrías observadas en los enlaces de hidrógeno.

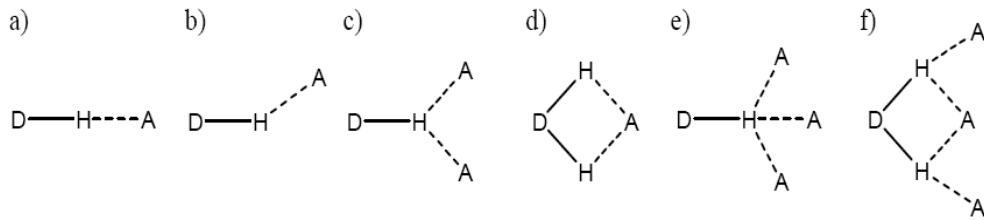


Figura 5. Geometrías del puente de hidrógeno a) lineal, b) doblada, c) donador bifurcado, d) aceptor bifurcado, e) trifurcado, f) triple centro bifurcado (Steed y cols., 2007).

Además de la geometría, la fortaleza de este tipo de interacción va a depender del tipo de átomo electronegativo que se encuentra enlazado al átomo de hidrógeno.

A pesar de que un enlace clásico de hidrógeno individualmente es débil (1-6Kcal/mol), conjuntamente pueden presentar una gran fuerza, interviniendo en la obtención de una conformación preferente mediante la formación de una estructura tridimensional rígida. Además, el requisito de la direccionalidad lo hace selectivo a la hora de diseñar complejos, por lo tanto, en la química supramolecular, es considerada como la interacción de mayor importancia ya que es responsable de la formación de uniones altamente organizadas y estables; sin embargo, es difícil estudiarlo en sistemas acuosos debido a que el agua es un excelente donador y aceptor de puente de hidrógeno (Figura 6) (Schneider y cols., 2009). La fuerza relativamente alta de estos enlaces y su direccionalidad hacen de ellos interacciones muy importantes, imprescindibles en la naturaleza, ya que gracias a ellas se mantiene la estructura de doble hélice del ADN, (Figura 7) (Kimsey y cols., 2015), o dirigen el plegamiento de las proteínas o son responsables de la selectividad de las enzimas.

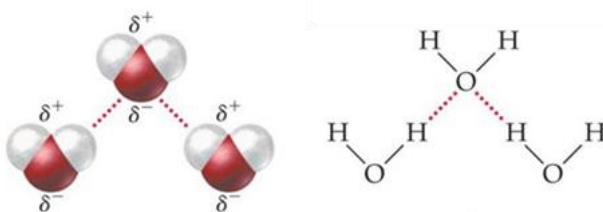
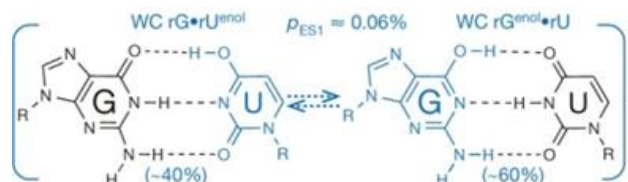


Figura 6.- Enlaces de hidrógeno en la molécula de agua.

Figura 7.- Equilibrio tautomérico en el emparejamiento de bases RNA.



4.2.3.- Interacciones $\pi-\pi$

Las interacciones que se establecen entre sistemas $\pi-\pi$ son de gran importancia en diferentes procesos biológicos ya que son responsables por ejemplo del apilamiento de proteínas, de la

estructura del ADN o, en el grafito, de la capacidad de que las capas que lo conforman se puedan deslizar fácilmente unas con respecto a otras (Figura 8) (Steed y cols., 2007).

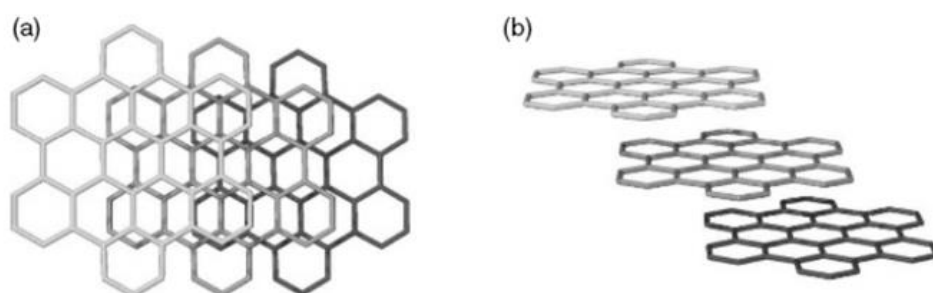


Figura 8.- Interacciones π - π borde-cara mantienen unidas a las capas de grafito. Representación de las capas a) con una visión desde arriba y b) con una visión de lado.

Las interacciones de los sistemas aromáticos son el resultado de la combinación de interacciones atractivas del tipo dipolo inducido-dipolo inducido (o dipolo-dipolo si hay heteroátomos en los anillos aromáticos), transferencia de carga entre un dador y un aceptor de electrones, efectos solvatofóbicos o fuerzas electrostáticas repulsivas entre las nubes electrónicas (Figura 9).

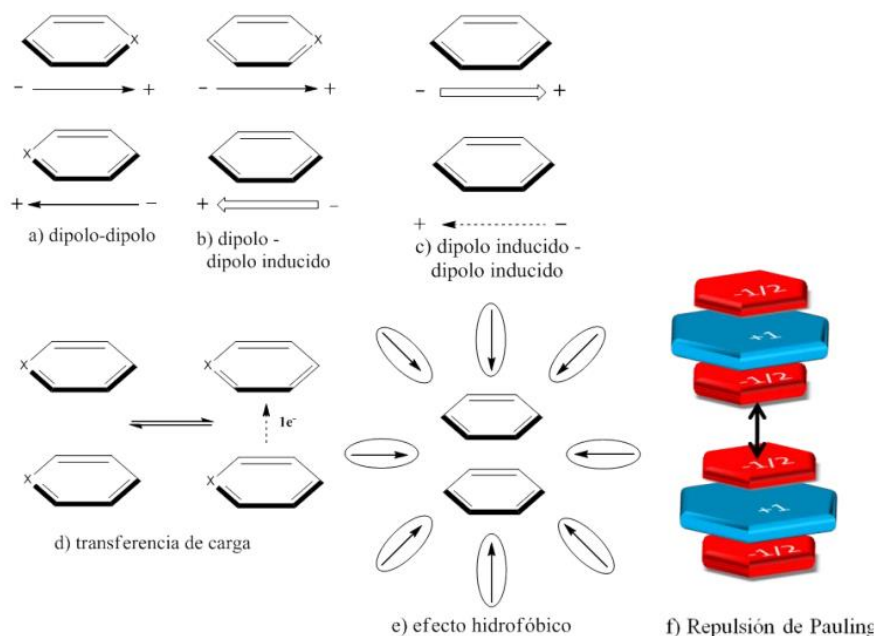


Figura 9.- Diferentes tipos de fuerzas que dan lugar a las interacciones π - π .

En 1990, Hunter y Sanders (Hunter y Sanders, 1990) propusieron un modelo basado en interacciones electrostáticas entre la distribución de carga π como una función de orientación

que permitió explicar las diferentes geometrías observadas en algunos sistemas $\pi-\pi$. El modelo considera que los compuestos aromáticos poseen una ligera polarización en los enlaces C-H que genera una ligera carga negativa en el centro del enlace en relación con una ligera carga positiva sobre los hidrógenos situados en el borde de la molécula, creándose dipolos moleculares (Figura 10a). En base a esto, existen dos orientaciones o conformaciones favorables principalmente: la primera conocida como geometría en forma de T (o borde a cara); consiste en la interacción de ambas moléculas entre un átomo de hidrógeno de un anillo aromático, que se encuentra en posición perpendicular, con el centro de otro anillo aromático mediante un enlace de hidrógeno (Figura 10b) (Nishio y cols., 1998), y la segunda cuando las dos unidades están desplazadas, y la interacción ocurre entre el centro de la cara de una de ellas con la periferia de la otra (Figura 10c). Existe un tercer tipo de interacción entre sistemas aromáticos, basado en los dos sistemas cara-cara paralelos, sin embargo, es poco favorable debido a interacciones repulsivas (Hunter y Sanders, 1990); (Staffilani y cols., 1997).

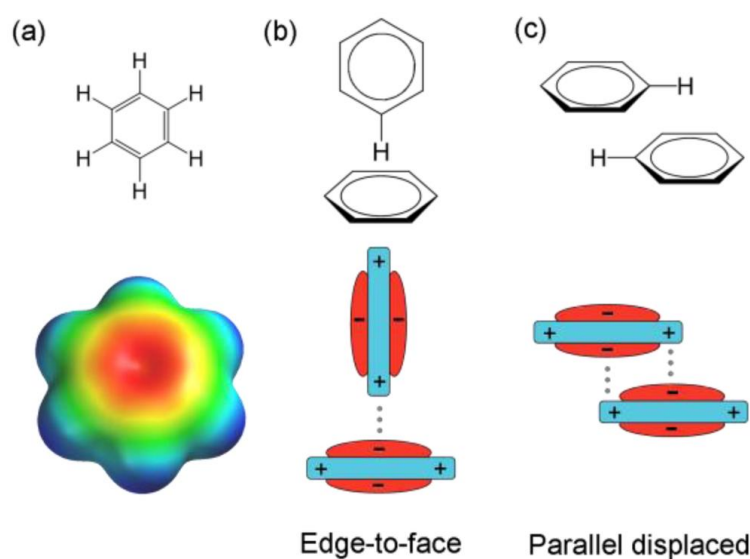


Figura 10.- Geometrías de las interacciones entre dos estructuras aromáticas. (a) Mapa del potencial electrostático del benceno; (b) geometría en forma de T (o borde a cara); (c) geometría en paralelo desplazada, la geometría más favorable energéticamente (Dhotel y cols., 2013).

Estas interacciones son débiles, (2.2 kJ/mol), sin embargo, los sistemas heterocíclicos, en los que se han incorporado O, N ó S son más propensos a presentar estas interacciones, debido a que se observa un incremento en la deslocalización de electrones en el sistema, estando favorecidas las conformaciones desplazadas; debido a que las cargas netas presentes en estos sistemas determinan su geometría y energía (Janiak, 2000).

4.2.4.- Interacciones de Van der Waals y dispersión de London

Estas interacciones surgen de la interacción de una nube electrónica que se encuentra polarizada debido a la acción de núcleos adyacentes, por lo que la fuerza de estas interacciones depende por un lado de la polarizabilidad de las moléculas que participan, siendo las más polarizables las que den lugar a interacciones más fuertes y por otro lado de la distancia, ya que realmente tienen importancia cuantitativa exclusivamente a distancias cortas o muy cortas.

Las interacciones de Van der Waals, pueden ser tanto atractivas como repulsivas (Figura 11), ya que las moléculas se atraen entre sí cuando se encuentran a una distancia moderada, pero, cuando sus nubes electrónicas empiezan a solaparse, las moléculas se repelen con fuerza. Son relativamente débiles, no direccionales, y muy importantes en campos como la química supramolecular, biología estructural, ciencia de polímeros, nanotecnología, ciencia de superficies y física de la materia condensada.

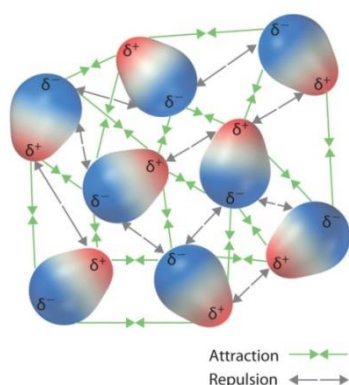


Figura 11.- Interacciones dipolo-dipolo atractivas y repulsivas.

Las fuerzas de dispersión de London tienen lugar en enlaces no polares y se origina por la aparición de dipolos instantáneos transitorios que todas las moléculas presentan debido a una distribución asimétrica de la nube electrónica alrededor del núcleo. Este dipolo instantáneo, con magnitud y dirección muy cambiantes, polariza a otra molécula e induce en ella un momento dipolar también instantáneo. Los dos dipolos se atraen mutuamente siendo por tanto el resultado de esta inducción una fuerza atractiva denominada fuerza dipolo inducido-dipolo inducido o fuerzas de London, y en consecuencia la energía potencial del par disminuye. Estas interacciones intermoleculares tienen un valor similar en agua y en disolventes orgánicos (Figura 12) (Van Benthem y cols., 2006). En la química supramolecular, más concretamente en sistemas ligando-receptor, estas interacciones juegan un papel muy importante.

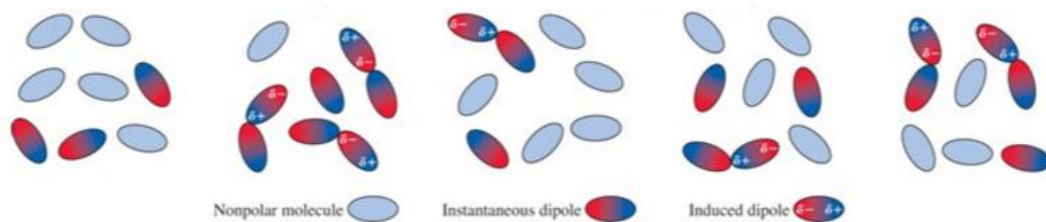


Figura 12.- Representación esquemática de las fuerzas de dispersión de London en moléculas no polares: algunas forman un dipolo instantáneo y éstos inducen a la formación de un dipolo en las moléculas vecinas.

4.2.5.- Efecto hidrofóbico

El efecto solvofóbico surge al desplazarse las moléculas de disolvente, que se encuentran en el interior de la cavidad de un receptor, al formarse el complejo receptor-ligando. Este efecto recibe el nombre de hidrofóbico cuando se produce en un medio acuoso. Durante años el origen del efecto hidrofóbico ha sido interpretado de diferentes maneras, siendo las más aceptadas aquellas que se basan en el aspecto termodinámico. En ellas los efectos hidrofóbicos poseen dos componentes energéticos principales: un efecto hidrofóbico entálpico, cuando un sustrato reemplaza a las moléculas de agua dentro de una cavidad y un efecto hidrofóbico entrópico debido a que la combinación de dos o más moléculas orgánicas en disolución acuosa para formar un complejo supramolecular provocan un aumento de la entropía, debido al desorden que se produce al salir las moléculas de la cavidad del receptor, lo que se traduce en una disminución de la energía libre global del sistema (Figura 13). Las interacciones hidrofóbicas entálpicas se dan fácilmente en sistemas donde las moléculas de agua interactúan débilmente con la cavidad hidrofóbica del receptor y la energía en el sistema es alta. Al reemplazar estas moléculas de agua por un ligando, la energía del sistema disminuye como consecuencia de la interacción entre las moléculas de agua que se encontraban en el interior y las del exterior (Steed y cols., 2007).

Se ha observado este tipo de interacción en diferentes sistemas como micelas, vesículas, proteínas, ácidos nucleicos, análisis de drogas, ...

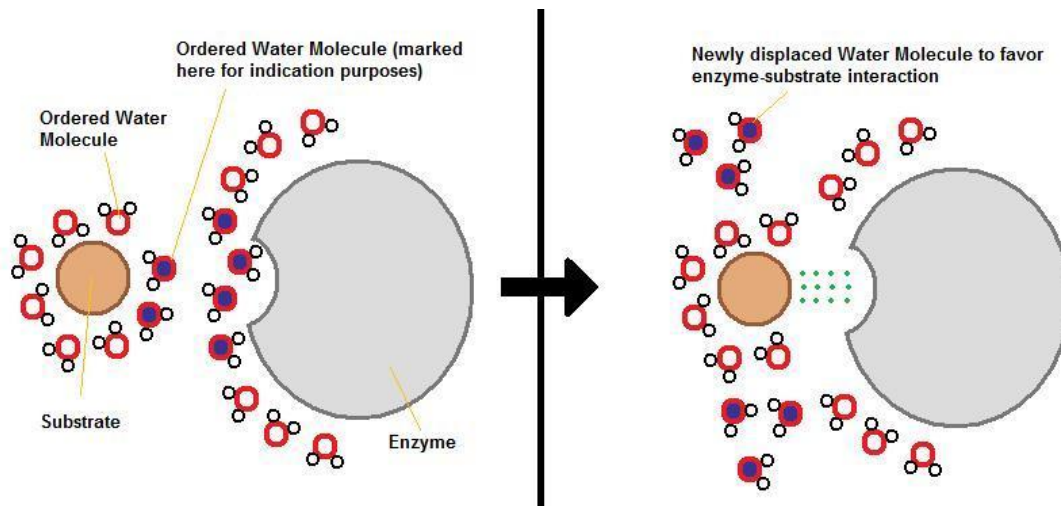
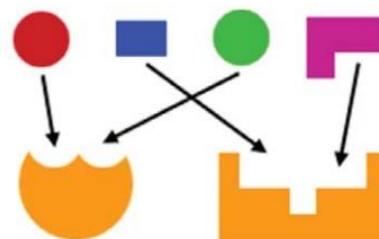


Figura 13.- El desplazamiento de las moléculas de agua ordenadas provoca un aumento de la entropía provocando que la formación del complejo enzima-sustrato sea termodinámicamente más favorable.

4.3.- Macromoléculas Sintéticas empleadas en el Reconocimiento Molecular

Cuando se pretende diseñar y sintetizar moléculas receptoras artificiales que puedan mimetizar los procesos biológicos, la Naturaleza sirve de inspiración a la química supramolecular para poder entender cada una de las etapas que ocurren en determinados de estos procesos, como la transcripción del código genético, la entrada de virus en las células, la inducción de la señal por neurotransmisores, etc. (Hunter, 2004); (Szalewick y cols., 2005); (Nandi y cols., 2007); (Krushelnitsky y cols., 2006). Es de esta manera cómo surge el concepto Química “Host-Guest” o “Huésped-Anfitrión” (Cram, 1983) basado en una evolución del modelo “Llave-Cerradura” postulado por Fischer (Fischer, 1894) a finales del siglo XIX, para describir cómo un enzima actúa y se une a un sustrato. Para que se produzca un reconocimiento molecular es preciso que la interacción sea selectiva y discrimine a un sustrato frente a otros. Según las características que tenga el receptor las funciones que pueden provocar pueden ser variadas, desde las más básicas como la catálisis o el transporte hasta otras más complejas como el auto-ensamblaje dando lugar a capas, membranas, vesículas, cristales líquidos, ...) (Figura 14).

Figura 14.- Modelo “llave-cerradura”, subrayando la complementariedad topológica imprescindible en el reconocimiento molecular



D. Koshland, (Koshland, 1958) tras varios estudios realizados, publicó, posteriormente algunas modificaciones al postulado de Fischer, conocido como el modelo de “encaje inducido”. En él concluyó que las enzimas son estructuras flexibles que pueden sufrir cambios conformacionales en su centro activo al darse la interacción con el sustrato, dando como resultado el complejo enzima-sustrato. Tras el reconocimiento, el sustrato es transformado en uno o varios productos y termina liberándose del punto de anclaje, dejando libre a la enzima (Figura 15).

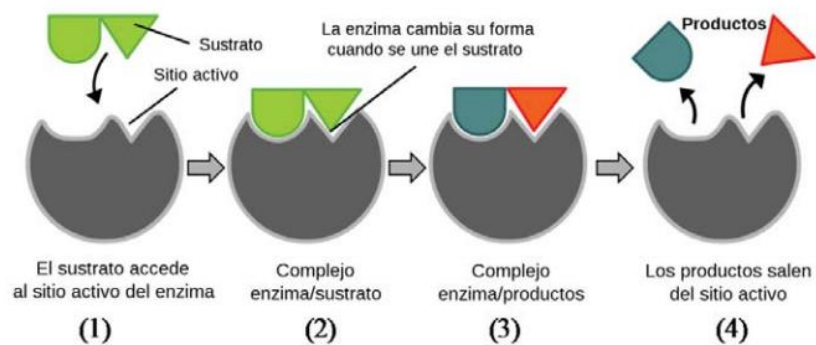


Figura 15.- Modelo “de encaje inducido”: (1) Reconocimiento del sustrato. (2) El receptor sufre un cambio conformacional, provocando que el proceso de ajuste sea más preciso. (3) Catálisis enzimática. (4) Liberación de los productos.

4.3.1.- Polímeros de Impresión Molecular (MIPs)

Los Polímeros de Impresión Molecular (MIPs) son definidos como “polímeros tridimensionales con huecos específicos inducidos por una molécula molde que sirven para el reconocimiento molecular y que dan lugar a un material donde el molde dirige la disposición y orientación de los componentes que lo forman mediante un mecanismo de autoensamblaje” (Henry y cols., 2005), es decir son materiales sintéticos que actúan como receptores biomiméticos artificiales ya que pueden de una manera específica y selectiva reconocer un determinado sustrato reproduciendo de forma básica, el mecanismo de acción de algunos sistemas biológicos como son los sistemas hormona-receptor, enzima-sustrato, o antígeno-anticuerpo (Sellergren, 2001). La obtención de estos materiales con “memoria selectiva” se basa en la síntesis de un polímero altamente entrecruzado, alrededor de una molécula que actúa como molde (plantilla o “template”) que se extrae tras la polimerización, generando una cavidad. El MIPs presentará, con respecto a la molécula molde, lugares de unión complementarios en cuanto a forma, tamaño y distribución de grupos funcionales, lo que permitirá posteriormente un reconocimiento molecular de forma selectiva, como una “cerradura” y una “llave” (Figura 16).

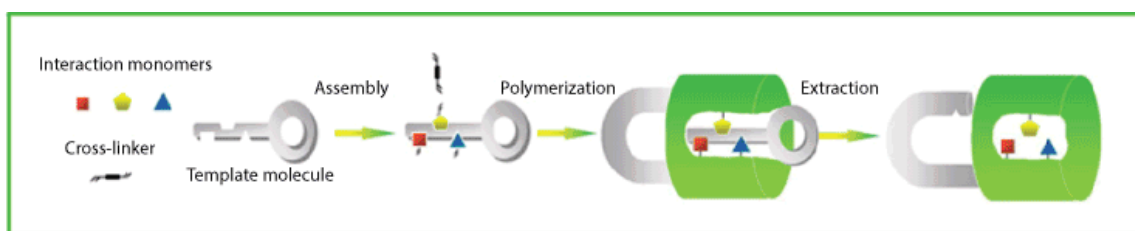


Figura 16.- Aplicación del modelo llave-cerradura al reconocimiento molecular de los MIPs (Suedee, 2013).

Los MIPs suelen presentar ventajas importantes con respecto a los receptores biológicos en las aplicaciones indicadas anteriormente:

- a) Posibilidad de *reconocimiento selectivo y específico* en medio orgánico.
- b) Tiempo de vida media largo ya que presenta una alta *estabilidad química, térmica y mecánica* frente a diferentes condiciones de pH, temperatura y presencia de disolventes orgánicos.
- c) *Reproducibilidad* en el proceso de síntesis con un bajo *coste* a gran escala.
- d) Aplicación a muy diversos moldes, incluyendo biomoléculas, sustancias tóxicas o especies para las que aún no se ha localizado un elemento de reconocimiento biológico.

Sin embargo, también presentan limitaciones, como un reconocimiento selectivo limitado en medio acuoso, constantes de afinidad moderadas, lo que implica una cinética de unión lenta, a veces el procedimiento de síntesis de los MIPs conlleva varias etapas o que se necesitan altas concentraciones de molécula molde. (Lanza y Sellergren, 2004).

4.3.2.- Métodos de obtención de los MIPs

Se puede distinguir cuatro procedimientos en la preparación de los MIPs (Mayes y Whitcombe, 2005), en base al modo en el que se determina la posición concreta de los grupos funcionales del polímero para que el reconocimiento sea óptimo:

- Método de impronta covalente
- Método de impronta no covalente
- Método semi-covalente
- Método de impronta mediante “espaciadores sacrificables”

4.3.2.1.-Método de impronta covalente

Es en 1972 cuando Wulff y Klotz (Wulff y Sarhan, 1972); (Takagishi y Klotz, 1972) presentaron, de forma independiente, los primeros ejemplos de impronta molecular covalente con polímeros orgánicos sintéticos, los cuales presentaban una selectividad predeterminada hacia determinadas moléculas.

En el modelo de impresión covalente (Figura 17) primero se produce la obtención de un complejo a partir de la molécula molde y los monómeros funcionalizados unidos entre sí mediante enlaces covalentes “reversibles”. Una vez obtenido este complejo de pre-polimerización, se adiciona un agente de entrecruzamiento, el iniciador y el disolvente en el que se lleva a cabo la polimerización (porogen), lo que permitirá la formación de una red tridimensional a través de la polimerización propiamente dicha. Esta polimerización generalmente sigue un mecanismo de propagación radicalico y puede estar inducida tanto térmica como fotoquímicamente. Finalmente, mediante medios químicos como una hidrólisis ácida/básica, se extrae el molde de la resina polimérica obteniéndose una estructura tridimensional que contiene cavidades de reconocimiento que son complementarias en forma, tamaño y con los grupos funcionales dispuestos en la posición adecuada a la molécula molde. Estas cavidades permiten, teóricamente, que el polímero impreso sea capaz de reconocer de forma selectiva tanto a la plantilla como a otros compuestos estructuralmente análogos.

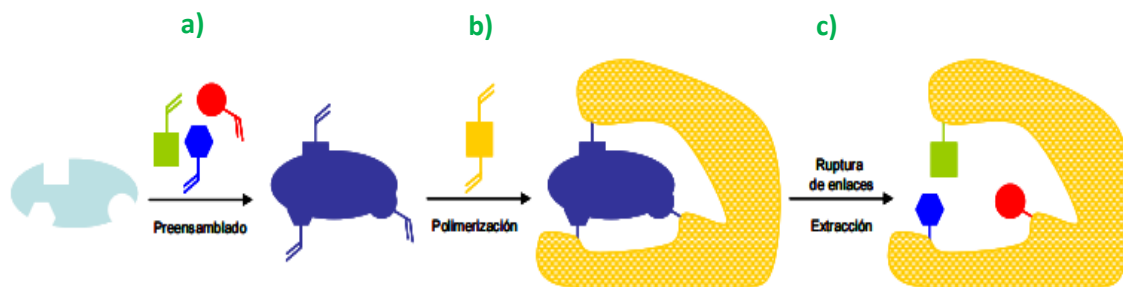


Figura 17.- Esquema de la preparación de MIPs de impresión covalente: a) formación del complejo de pre-polimerización entre la molécula molde y los monómeros funcionalizados; b) adición del agente de entrecruzamiento y polimerización; c) extracción del molde.

El tipo de enlace covalente “reversible” que se han empleado en la preparación del complejo de pre-polimerización ha sido principalmente:

- Éster borónico para la impresión de galactosa y fructosa (Wulff y cols., 1977); (Takeba y cols., 1998) (Figura 18), nucleótidos (Sallacan y cols., 2002), etc.

- Base de Schiff en la síntesis de MIPs enantioselectivos para aminoácidos (Verdon y Couëdor, 1999).
- Enlace acetal para la formación de polímeros de plantillas basadas en mono- y diacetona (Heller y cols., 2006).

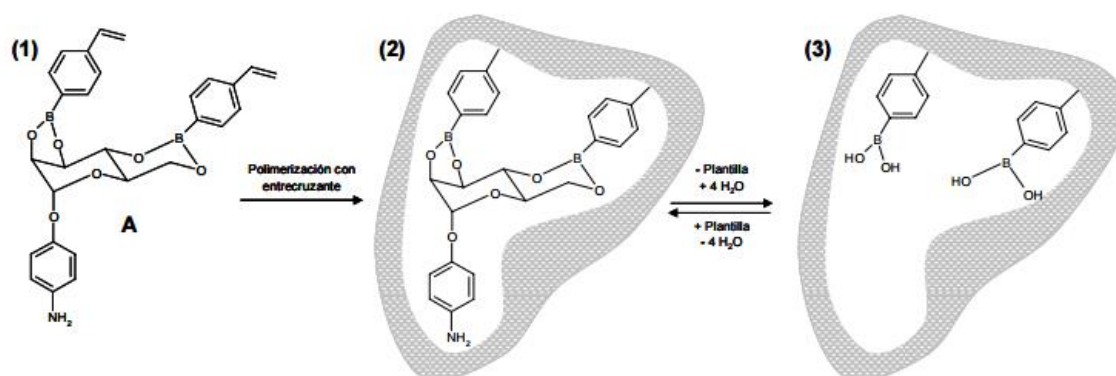


Figura 18.-. MIPs del 4-nitrofenil- α -D-manopiranosido-2,3:4,6-di-O-(4- vinilfenilboronato) (A). (1) Formación del complejo de pre-polimerización entre el ácido 4-vinilbenzenoborónico y el 4-nitrofenil- α - D-manopiranosido; (2) adición del agente de entrecruzamiento, divinilbenzeno o etilenglicol dimetacrilato y polimerización; (3) extracción del molde a través de la hidrólisis de los grupos éster del boronato y la adición de 4 equivalentes de agua. La unión de la molécula molde al polímero es reversible (Wulff y cols., 1977).

Las principales ventajas en este tipo de polimerización se basan en que al realizarse la síntesis en condiciones estequiométricas, por un lado, se minimiza considerablemente la presencia de interacciones inespecíficas, ya que no hay monómeros fuera de las cavidades, de ahí su elevada selectividad; mientras que por otro lado se obtienen polímeros que presentan centros activos con una elevada homogeneidad y bien definidos, es decir muy similares entre sí. Sin embargo, este método de síntesis presenta limitaciones importantes como es que el número de monómeros capaces de formar enlaces covalentes reversibles con la plantilla es limitado, o la ruptura química del molde de la matriz polimérica, así como una cinética de unión más lenta, ya que el reenlace de la molécula impresora con análogos al molde, son también covalentes. A pesar de haber sido el primer método en desarrollarse, debido a las limitaciones que presenta su aplicación ha sido considerablemente escasa.

4.3.2.2.- Método de impronta no covalente

Fue a principios de los años 80, cuando el grupo de Mosbach sintetizó geles de poliacrilamida selectivos a varios indicadores y alcaloides (Andersson y cols., 1984) introduciendo un avance importante en el campo de la impresión molecular al desarrollar un modelo no-covalente. La diferencia con el método de impronta covalente radica en que, en este proceso, el complejo de pre-polimerización no se prepara a través de enlaces covalentes, sino que se emplean interacciones moleculares de carácter débil, del tipo de enlaces de hidrógeno, interacciones π - π , dipolo-dipolo, electroestáticas y/o hidrofóbicas, que originan un preordenamiento molecular maximizando la interacción entre las dos especies. Estas interacciones pueden darse en uno o más puntos de las moléculas. En este método el molde se extrae de la matriz entrecruzada utilizando un disolvente capaz de anular las interacciones no covalentes específicas con el monómero funcional. (Figura 19).

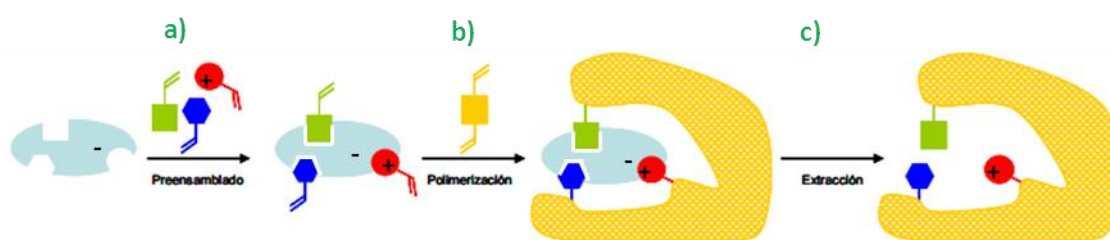


Figura 19.- Esquema de la preparación de MIPs de impronta no covalente; a) formación del complejo de pre-polimerización entre la molécula molde y los monómeros funcionalizados; b) adición del agente de entrecruzamiento y polimerización; c) extracción del molde.

Este método es más flexible ya que hay una mayor variedad de monómeros y de moléculas impresoras, pero presenta el inconveniente de que las cavidades de unión que se obtienen son más heterogéneas debido al movimientos relativos entre la molécula molde y el polímero, por lo que son menos selectivas. Con este método, al emplearse interacciones débiles, el reenlace de la molécula presenta una cinética de unión muy favorable.

4.3.2.3.- Método semi-covalente

El modelo semi-covalente combina las ventajas de los dos métodos de impresión anteriores. En este caso, la síntesis de la matriz se realiza del mismo modo que en el modelo covalente, la molécula se imprime como un complejo estable mediante interacciones covalentes, sin embargo, las interacciones implicadas en el reconocimiento posterior de los moldes análogos, es de naturaleza no covalente (Figura 20).

Este modelo fue formulado por primera vez por Sellergren y Andersson en 1990 al sintetizar un MIPs a partir del acetato de *p*-aminofenilalanina. Tras la hidrólisis del enlace amida formado entre el monómero y la plantilla, los restos de ácido carboxílico presentes en la matriz polimérica eran capaces de interactuar con el aminoácido mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno (Sellergren y cols., 1990).

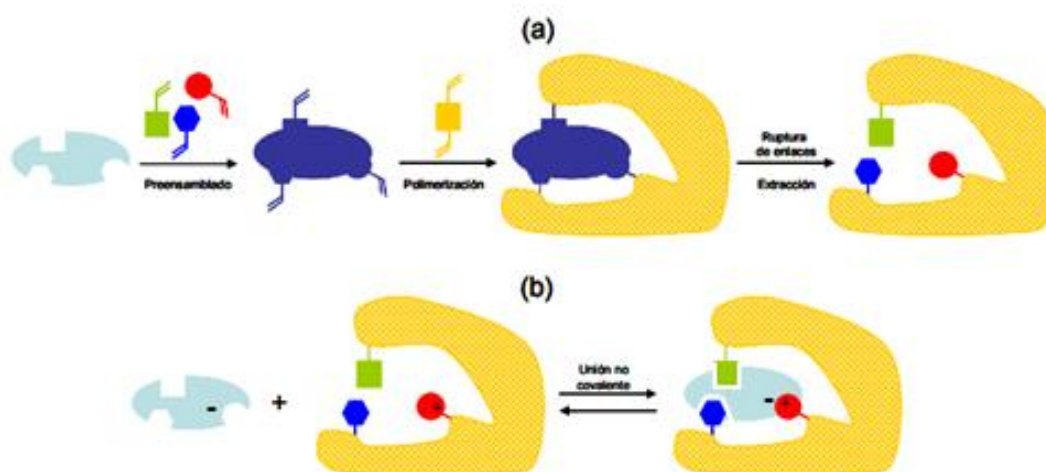


Figura 20. Esquema de la preparación de MIPs de impresión semi-covalente. (a) Síntesis del MIP mediante impresión covalente, (b) Reenlace de la molécula molde mediante interacciones no covalentes.

Con respecto a las ventajas que presenta esta técnica destaca el hecho de que, al eliminar la necesidad de formar un enlace covalente reversible durante la utilización del polímero, se pueden emplear diferentes tipos de monómeros y/o plantillas que permitan la formación de enlaces covalentes más fuerte y estables durante la síntesis del MIP. Por ejemplo, se ha empleado con éxito la formación de enlaces de tipo éster en métodos semi-covalentes porque en los casos en los que la hidrólisis ácida o básica del enlace éster no sea posible, se puede emplear LiAlH_4 para poder reducirlo (Byström y cols., 1993). Así se han preparado MIPs capaces de reconocer, testosterona (Sneschkoff y cols., 2002), bisfenol A (Joshi y cols., 1999), 4-nitrofenol (Caro y cols., 2002) o esteroides (Byström y cols., 1993). Al igual que el método covalente la matriz tridimensional presentará una extraordinaria selectividad y una mayor homogeneidad en la distribución de puntos de unión.

Su principal desventaja deriva de las diferencias estéricas que existe entre los enlaces covalente y no covalente, ya que el enlace no covalente necesita una mayor distancia para su formación que uno covalente. Además, este método conlleva una importante carga sintética necesaria para la fabricación de los monómeros funcionales.

4.3.2.4.-Método de impronta mediante “espaciadores sacrificables”

Este método surge cuando Whitcombe (Whitcombe y cols., 1995) pretende solucionar la limitación de la distancia de enlace que presentaba el modelo semi-covalente introduciendo un espaciador, en concreto un grupo carbonilo, entre el monómero funcionalizado y el molde. Dicho grupo espaciador se eliminó posteriormente en forma de CO₂ durante la hidrólisis del enlace formado en el complejo de pre-polimerización (Figura 21).

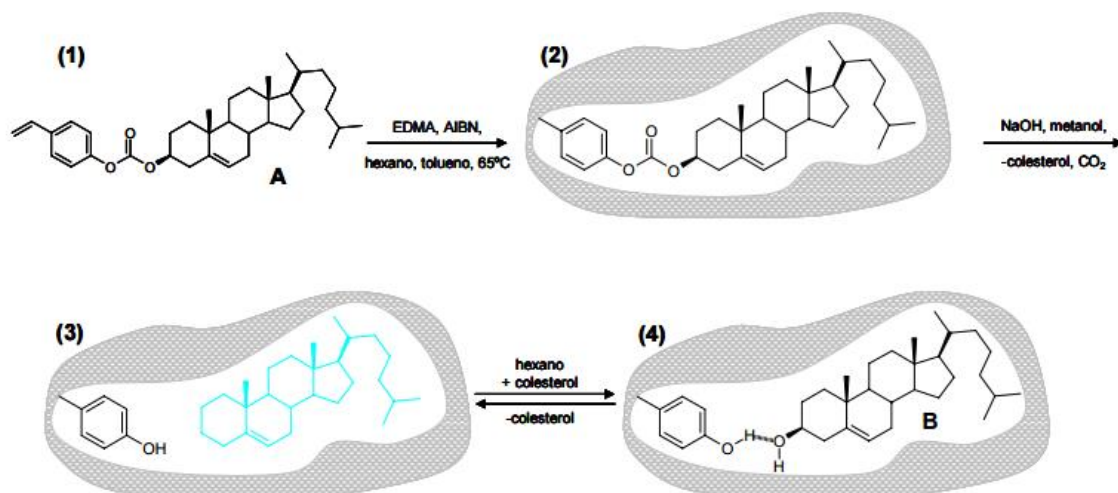


Figura 21. Preparación de MIPs selectivos al colesterol empleando al grupo carbonilo como espaciadores sacrificables (B). (1) El complejo de pre-polimerización colesteril (4-vinil) fenilcarbonato (A) polimeriza con EDMA; (2) la molécula A permanece unida covalentemente al polímero resultante; (3) hidrólisis alcalina que elimina al molde a la vez que se produce la pérdida del espaciador (CO₂) obteniéndose un MIP con un grupo fenol en la zona de reconocimiento; (4) reconocimiento del colesterol mediante enlace de hidrógeno con el fenol.

La mayoría de los MIPs preparados utilizan plantilla altamente funcionalizadas, con grupos amino, amido, carboxilo y carbonílicos. La obtención de MIPs mediante “espaciadores sacrificables” permite ampliar la impronta molecular a MIPs con otras características químicas, ya que esta técnica otorga la capacidad de formar enlaces de hidrógeno débiles o desarrollar interacciones que involucren electrones π de sistemas aromáticos, que no se formarían con monómeros funcionales convencionales.

Otro ejemplo nos lo proporciona J. Chen (Qi y cols., 2010) que empleó el método semi-covalente con un grupo carbonilo como espaciador sacrificable para sintetizar una MIP para el 4-clorofenol. El MIP preparado a partir de 4-clorofenil (4-vinil) fenil carbonato resultó ser el mejor monómero funcionalizado (Figura 22).

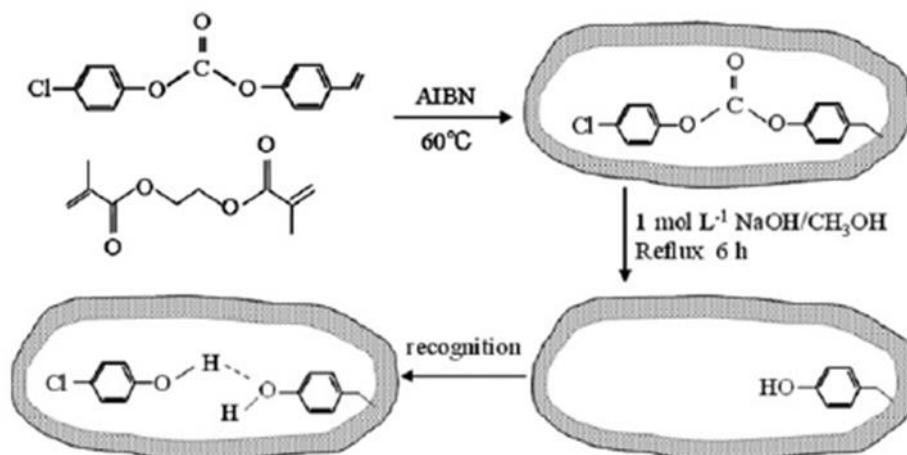


Figura 22. Preparación de MIPs selectivos al 4-clorofenol empleando al grupo carbonilo como espaciadores sacrificables.

4.3.3.- Optimización a nivel sintético de los MIPs en el Reconocimiento

Son varios los parámetros a optimizar en la síntesis de los MIPs: los monómeros funcionales, el agente de entrecruzamiento, el disolvente porógeno, el iniciador, así como la metodología empleada.

Son numerosas las variables del proceso de impronta las que determinan la selectividad y las características del polímero impreso, de manera que la optimización del proceso resulta bastante compleja. Por un lado, la naturaleza y proporción del molde, los monómeros funcionales y el agente de entrecruzamiento, ya que van a determinar la existencia de interacciones complementarias entre ellos, siendo por ello imprescindible un amplio conocimiento de su comportamiento para diseñar una organización molecular lógica, con una morfología y selectividad adecuada. Así tenemos como la concentración del monómero funcional tiene un papel muy importante en una adecuada formación del complejo de pre-polymerización, ya que un exceso provocaría un aumento de las interacciones no específicas y por tanto una disminución de la selectividad, mientras que una baja concentración provocaría un mal rendimiento en el proceso de impresión. Por otro lado, el disolvente empleado en la polimerización determina la accesibilidad a los sitios de unión. Por último, tanto la temperatura como el proceso de extracción del molde afectan al equilibrio entre ésta y los monómeros funcionales.

A continuación, se describen los distintos factores que influyen en las propiedades de reconocimiento de los MIPs.

4.3.3.1.- Monómeros funcionales

Es decisivo encontrar un monómero funcional adecuado, que complemente a la molécula molde a la vez que maximice y estabilice la formación del complejo. Normalmente pueden combinarse distintos monómeros para aumentar las interacciones y mejorar la complementariedad aportando una mejor selectividad. Los monómeros funcionales se suelen seleccionar en base al carácter ácido o básico de la plantilla. El método de impresión no covalente es el más flexible en cuanto a la elección de los monómeros funcionalizados que complementan a los grupos funcionales de la plantilla. Los monómeros más utilizados en la preparación de MIPs no covalentes son los derivados de los ácidos carboxílicos, ya que pueden interactuar de múltiples maneras tanto como aceptor como dador de protones en la formación de enlaces por puente de hidrógeno, participar en la formación de pares iónicos o en la formación de enlaces dipolo-dipolo. El más utilizado es el ácido metacrílico (MAA), ya que puede actuar a través de interacciones iónicas con las aminas y mediante enlaces de hidrógeno con las amidas, carbamatos y grupos hidroxilo. Cuando la plantilla es de naturaleza ácida, se puede recurrir al empleo de un monómero básico. En las Tablas 2-4 se presentan algunos de los monómeros más utilizados en estos mecanismos de polimerización.

Tabla 2.- Monómeros ácidos empleados en la síntesis de MIPs

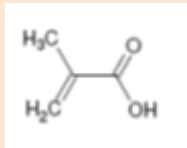
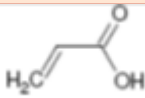
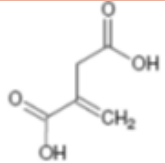
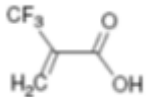
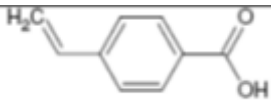
Monómero	Fórmula	Aplicaciones
Ácido metacrílico		Aminoácidos Péptidos Teofilina Propanolol Morfina Monosacáridos Triazinas Benzimidazoles
Ácido acrílico		Aminoácidos
Ácido itacónico		Timolol Norefedrina
Ácido trifluorometacrílico		Atrazina Nicotina Alcaloides de cinchona
Ácido p-vinilbenzoico		Aminoácidos

Tabla 2 (continuación).- Monómeros ácidos empleados en la síntesis de MIPs

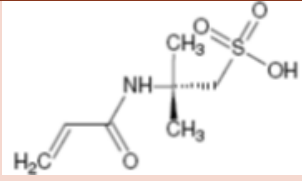
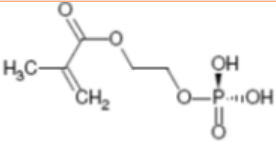
Monómero	Fórmula	Aplicaciones
Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico		Desmetrín
Fosfato de 2-(metacrililoxi)etilo		Esteroles

Tabla 3.- Monómeros básicos empleados en la síntesis de MIPs

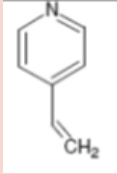
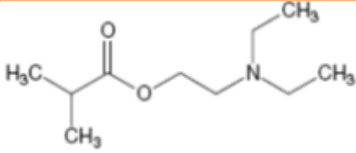
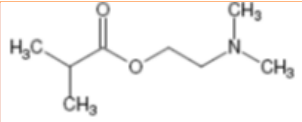
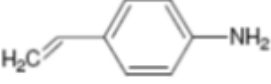
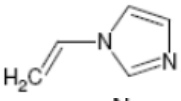
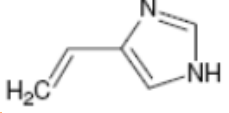
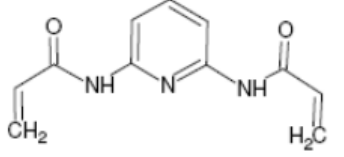
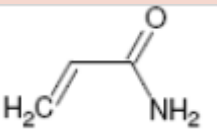
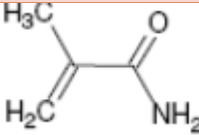
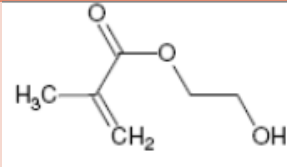
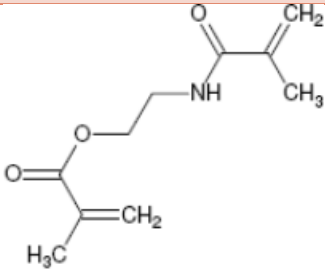
Monómero	Fórmula	Aplicaciones
4-Vinilpiridina		Naproxeno Aminoácidos
Dietilaminoetilmetacrilato		Atrazina
Dimetilaminoetilmetacrilato		Compuestos ácidos
p-Aminoestireno		Colorantes alimenticios
1-Vinilimidazol		Aminoácidos
4(5)-Vinilimidazol		ATP
2,6-Bisacrilamidopiridina		Barbitúricos

Tabla 4.- Monómeros neutros empleados en la síntesis de MIPs

Monómero	Fórmula	Aplicaciones
Acrilamida		Aminoácidos
Metacrilamida		Fenitoína
2-Hidroximetilmetacrilato		AMP Efedrina Colesterol
N,O-bismetacriloil etanolamina		Empleo como entrecruzante en la preparación de OMNiMIPs

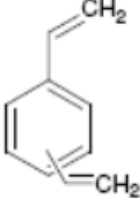
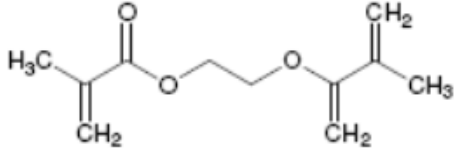
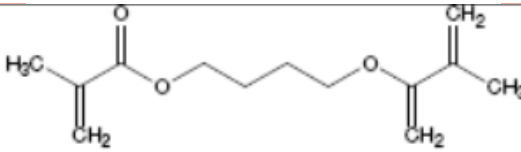
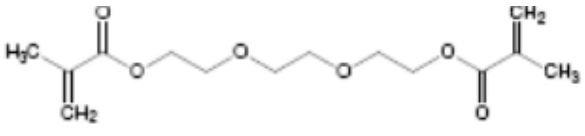
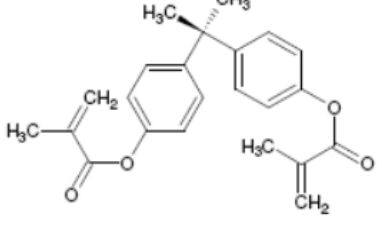
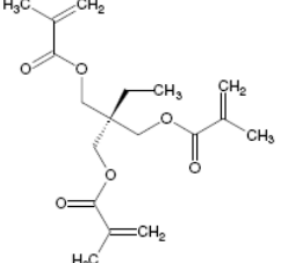
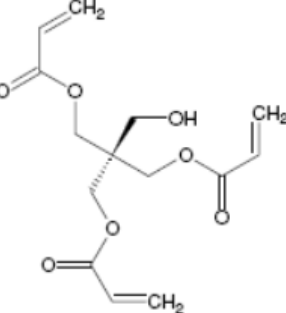
4.3.3.2.- Agente de entrecruzamiento

La función del agente de entrecruzamiento se resume en cuatro aspectos fundamentales (Cormack y Elorza, 2004).

- Es el responsable principal de la morfología final de la matriz polimérica.
- Estabiliza los puntos de unión selectivos formados en la polimerización.
- Aporta estabilidad mecánica y térmica al material sintetizado, evitando deformaciones o desestructuraciones, a través del grado de entrecruzamiento.
- Proporciona la porosidad adecuada que garantice el acceso del molde a las cavidades generadas.

En general, la manera de asegurar que se van a dar estas características, es emplear la cantidad necesaria de estos reactivos para poder alcanzar un grado de entrecruzamiento mayor del 80%. Una proporción baja del agente de entrecruzamiento generaría a una matriz de baja capacidad de reconocimiento, así como una baja selectividad, mientras que un exceso, conduciría a una matriz muy rígida, sin flexibilidad impidiendo la accesibilidad del molde a los lugares de unión (Selligren, 2001). A continuación, se recogen algunos de los agentes de entrecruzamiento más empleados.

Tabla 5.- Agentes de entrecruzamiento empleados en la síntesis de MIPs

Monómero	Fórmula	Aplicaciones
Divinilbenceno		Nicotina
Etilenglicol-Dimetacrilato (EDMA)		Triazinas Tiabendazol
1,4-Butanodiol-dimetacrilato		Fenilalanina
Trietilenglicol-Dimetacrilato		Atrazina
Bisfenol A-Dimetacrilato		Enantiómeros
Trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM)		Estradiol Zearalenona
Pentaeritritol tracrilato		Efedrina Aminoácidos

4.3.3.3.- Disolvente porógeno

El disolvente porógeno realiza un doble papel, como disolvente clásico y como agente porogénico, por lo que afecta tanto la naturaleza del mismo, ya que ésta gobierna la fuerza de

las interacciones, como el volumen añadido a la mezcla de polimerización, ya que influye en el proceso de reconocimiento molecular. Así el acetonitrilo produce mesoporos, mientras que el cloroformo genera microporos. En el método de impronta no covalente el disolvente influye drásticamente en la interacción monómero-molécula plantilla. El disolvente se elige en función de su capacidad para estabilizar el complejo de pre-polimerización, de manera que disolventes apróticos con bajas constantes dieléctricas, como cloroformo, tolueno o acetonitrilo, facilitan la unión por enlaces de hidrógeno y electrostáticos. Mientras que los disolventes próticos, por ejemplo: agua o metanol, son los adecuados cuando las interacciones son de carácter hidrofóbico (Sellergren, 2001).

4.3.3.4.- Iniciador

El iniciador es el responsable del comienzo de la polimerización al generar radicales en la reacción de polimerización. La elección del indicador se realiza en función de las características del resto de componentes del sistema, como por ejemplo la estabilidad de los reactivos empleados, la temperatura a la cual se va a llevar a cabo la polimerización. La polimerización puede comenzar empleando radiación UV o calor, dependiendo de la estructura del iniciador. El compuesto más utilizado es el azo-derivado 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (AIBN), bien como iniciador fotoquímico a bajas temperaturas (Cederfur y cols., 2003) o térmico (≥ 60 °C) (Sellergren, 1989). Otros iniciadores fotoquímicos y térmicos utilizados en impronta molecular son el 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (ABCHC), 2,2'-azobis[(2,4- dimetilvaleronitrilo)] (ABDV) y el 4,4'-azobis[(4-ácido cianoaléxico)] (ACVA), peróxido de benzoilo (BPO), etc. (Cormack y Elorza, 2004).

En cualquier caso, lo más probable es que con la impronta molecular se generen materiales con una amplia distribución de sitios de unión, de los cuales sólo una determinada fracción presentará selectividad frente a la plantilla. De forma general, los polímeros preparados empleando tanto la metodología covalente como la no covalente, se caracterizan por una distribución no uniforme (heterogénea) de los lugares de unión, debido a que parte de los puntos de unión pueden interactuar favorablemente con el molde, pero otros puntos pueden unirse de una manera menos favorable o incluso inespecífica (Ramamurthy y Schanze, 2001).

4.4.- Nuevos Métodos

El procedimiento típico en una síntesis de MIPs corresponde a una polimerización radicalica de una solución concentrada de monómeros funcionalizados iniciada térmica o fotoquímicamente. De esta manera se obtiene una matriz polimérica tridimensional insoluble.

Debido al elevado número de variables que pueden influir en las características del polímero final obtenido, la optimización del proceso de síntesis resulta considerablemente complejo, haciendo que estos métodos sean generalmente tediosos y consuman mucho tiempo de tal manera que obtener un MIP con las propiedades de unión óptimas puede llevar días e incluso semanas, sobre todo si las proporciones de los reactivos a emplear, son seleccionadas a partir de ensayos de prueba y error.

Para evitar estos inconvenientes, actualmente se han desarrollado tres tipos de aproximaciones para facilitar la optimización de los procesos de síntesis:

- Empleo de los denominados mini- MIPs. Esta técnica se fundamenta en el empleo de un dispensador automático de disoluciones, capaz de mezclar un pequeño volumen de cada uno de los reactivos que intervienen en la polimerización en diferentes viales, con una variación sistemática de las mezclas empleadas en la síntesis de los polímeros. Después de la extracción de la plantilla mediante repetidos lavados de los polímeros, se aplica un método de “screening”, ya sea secuencial o en paralelo, con el objeto de evaluar el funcionamiento de los diferentes polímeros obtenidos. Posteriormente se sintetizarán mayores cantidades de aquellos polímeros para los que se haya obtenido un mayor grado de reconocimiento para una evaluación más detallada.
- Métodos quimiométricos: permite optimizar un elevado número de variables de forma simultánea, ya que se genera una matriz multidimensional que incluye todas las posibles variables de todos los parámetros que pueden influir en el funcionamiento de la matriz. Posteriormente se seleccionan los pocos experimentos representativos siendo éstos los que se preparan y caracterizan (Mayes y Whitcombe, 2005).
- Modelización Molecular: El estudio de la dinámica molecular de la interacción de la plantilla con diferentes polímeros previamente modelizados. Mediante estos métodos se han desarrollado polímeros de alta calidad para moléculas como creatinina (Subrahmanyam y cols., 2001), efedrina (Piletsky y cols., 2001) o microcistina LR (Chianella y cols., 2003) (Figura 23).

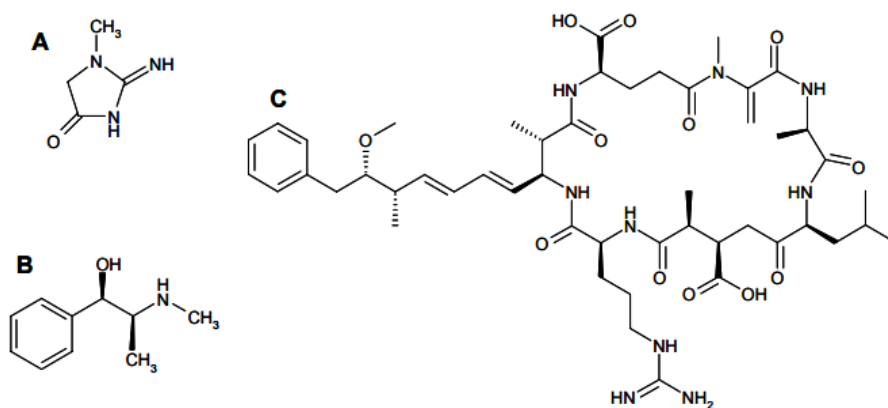


Figura 23. (A) Creatinina; (B) Efedrina; (C) Microcistina-LR. Moléculas sobre las cuales se ha utilizado métodos de modelización molecular para la selección de las condiciones óptimas de impronta.

5. CONCLUSIONES

- Las interacciones no covalentes son las relevantes en el reconocimiento molecular. Aunque los enlaces de hidrogeno son de las interacciones más importantes para la química supramolecular, todas las interacciones no covalentes son importantes porque en una molécula no se suele dar solo un tipo de interacción.
- El reconocimiento molecular precisa que la interacción sea selectiva y discrimine un sustrato de otro, para poder realizar una función específica
- Para diseñar nuevos receptores moleculares más selectivos hay que tener en cuenta la complementariedad estérica y química, ya que es imprescindible que exista complementariedad espacial y química entre el receptor y el sustrato.
- Debido a la importancia de los factores que intervienen en las propiedades de reconocimiento de los MIPs, su optimización es compleja pero indispensable. Fundamentalmente se optimizan los monómeros funcionales, que se seleccionan en base a las características ácido/base de la plantilla; el agente de entrecruzamiento, que debe ser empleado en cantidad necesaria para un grado de entrecruzamiento mayor del 80%; el disolvente porógeno, que se elige en función de la capacidad para estabilizar el complejo pre-polimerización; y el iniciador, cuya elección es en función a las características del resto de componentes del sistema.
- Actualmente las investigaciones están siendo encaminadas a facilitar la optimización de los métodos ya existentes. De forma que se pueda obtener un gran número de polímeros con alto rendimiento y posteriormente ensayar su utilidad.

6. BIBLIOGRAFÍA

Amabilino D, Stoddart J. Self-assembly and macromolecular design. *Pure and Applied Chemistry*. 1993; 65 (11): 2351-2359.

Amit AG, Mariuzz RA, Phillips SEV, Poliak RJ. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science*. 1988; 233 (4765): 747-753.

Andersson LI, Sellergren B, Mosbach K. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Lett*. 1984; 25 (45): 5211-5214.

Byström SE, Börje A, Akermark B. Selective reduction of steroid 3- and 17-ketones using lithium aluminum hydride activated template polymers. *J. Am. Chem. Soc*. 1993; 115 (5): 2081-2083.

Caro E, Masqué N, Marcé RM, Borrull F, Cormack PAG, Sherrington DC. Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples. *J. Chromatogr. A*. 2002; 963: 169-178.

Carrillo R, Feher-Voelger A, Martín T. Enantioselective Cooperativity between Intra-Receptor Interactions and Guest Binding: Quantification of a Reinforced Chiral Recognition. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2011; 50: 10616 – 10620.

Cederfur J, Pei Y, Zihui M, Kempe M. Synthesis and screening of a molecularly imprinted polymer library targeted for penicillin G. *J. Comb. Chem*. 2003; 5 (1): 67-72.

Chianella I, Piletsky SA, Tothill IE, Chen B, Turner APF. MIP-based solid phase extraction cartridges combined with MIP-based sensors for the detection of microcystin-LR. *Biosens. Bioelectron*. 2003; 18 (2-3): 119-127.

Cormack PAG, Elorza AZ. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *J. Chromatogr. B*. 2004; 804 (1): 173-182.

Cram DJ. Cavitands: Organic Hosts with Enforced Cavities. *Science*. 1983; 219 (4589): 1177-1183.

Dhotel A, Chen Z, Delbreilh L, Youssef B, Saiter JM, Tan L. Molecular Motions in Functional Self-Assembled Nanostructures. *Int. J. Mol. Sci*. 2013; 14: 2303-2333.

Fernández-González A, Guardia L. Reconocimiento molecular mediante materiales biomédicos: impresión molecular. *An. Quím*. 2007; 103(2): 14-22.

Fischer E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1894; 27 (3): 2985-2993.

Gellman SH, Introduction: Molecular Recognition, Chem. Rev. 1997; 97 (5): 1231 – 1734.

Heller DN, Smith ML, Chiesa OA. LC/MS/MS measurement of penicillin G in bovine plasma, urine, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals. J. Chromatogr. B. 2006; 830 (1): 91-99.

Henry OY, Cullen DC, Piletsky SA. Optical interrogation of molecularly imprinted polymers and development of MIP sensors: a review. Anal. Bioanal. Chem. 2005; 382 (4): 947-56.

Hunter CA, Sanders JKM. The nature of π - π interactions. J. Am. Chem. Soc. 1990; 112 (14): 5525-5534.

Hunter CA. Quantifying Intermolecular Interactions: Guidelines for the Molecular Recognition Toolbox. Angew. Chem., Int. Ed. 2004; 43 (40): 5310-5324.

Janiak C. A critical account on π - π stacking in metal complexes with aromatic nitrogen-containing ligands. Dalton Trans. 2000; 21: 3885-3896.

Joshi VP, Karmalkar RN, Kulkarni MG, Mashelkar RA. Effect of Solvents on Selectivity in Separation Using Molecularly Imprinted Adsorbents: Separation of Phenol and Bisphenol A. Ind. Chem. Engn. Res. 1999; 38 (11): 4417-4423.

Kimsey IJ, Petzold K, Sathyamoorthy B, Stein ZW, Al-Hashimi HM. Visualizing transient Watson-Crick-like mispairs in DNA and RNA duplexes. Nature. 2015; 519: 315–320.

Koshland D. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. PNAS. 1958; 44 (2): 98-104.

Krant J. How Do Enzymes Work? Science. 1988; 242 (4878): 533-540.

Krushelnitsky A. Intermolecular electrostatic interactions and Brownian tumbling in protein solutions. Phys. Chem. Phys. 2006; 8: 2117-2128.

Langford S, Pérez-García L, Stoddart J. Self-assembly in chemical synthesis. Supramolecular Chemistry. 1995; 6: 11-27.

Lanza F, Sellergren B. Molecularly Imprinted Polymers via High-Throughput and Combinatorial Techniques. Macromol. Rapid. Commun. 2004; 25 (1): 59-68.

Lehn JM. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*. VCH. New York; 1995. p. 11-30.

Lehn JM. *Supramolecular Chemistry: Receptors, Catalysts, and Carriers*. *Science*. 1985; 227 (4689): 849-856.

Lehn JM. Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. *PNAS*. 2002; 99 (8): 4763-4768.

Mahon C, Fulton D. Mimicking nature with synthetic macromolecules capable of recognition. *NCHEM*. 2014; 6: 665-672.

Mayes AG, Whitcombe MJ. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57 (12): 1742-1778.

Nandi N, Vollhardt D. Molecular interactions in amphiphilic assemblies: theoretical perspective. *Acc. Chem. Res.* 2007; 40 (5): 351-360.

Nishio M, Hirota M, Umezawa Y. *The CH/π Interaction. Evidence, Nature, and Consequences*. Wiley-VCH: New York; 1998.

Philp D, Stoddart J. Self-assembly in natural and unnatural systems. *Angewandte Chemie-International Edition*. 1996; 35 (11): 1155-1196.

Pichon V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. A*. 2007; 1152: 41-53.

Piletsky SA, Karim K, Piletska EV, Day CJ, Freebairn KW, Legge C, Turner APF. Recognition of ephedrine enantiomers by molecularly imprinted polymers designed using a computational approach. *Analyst*. 2001; 126: 1826-1830.

Qi P, Wang J, Wang L, Li Y, Jin J, Su F, Tian Y, Chen J. Molecularly imprinted polymers synthesized via semi-covalent imprinting with sacrificial spacer for imprinting phenols. *Polymer*. 2010; 51 (23): 5417-5423.

Ramamurthy V, Schanze KS. *Molecular and Supramolecular Photochemistry: Optical Sensors and Switches*. Vol 7. Nueva York. EE.UU: M. Dekker; 2001.

Sallacan N, Zayats M, Bourenko T, Kharitonov AB, Willner I. Imprinting of nucleotide and monosaccharide recognition sites in acrylamidephenylboronic acid-acrylamide copolymer membranes associated with electronic transducers. *Anal. Chem.* 2002; 74 (3): 702-712.

Schneider L, Stock CM, Dieterich P, Jensen BH, Pedersen LB, Satir P et al. The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 is required for directional migration stimulated via PDGFR- α in the primary cilium. *JCB*. 2009; 185 (1): 163-176.

Sellergren B, Andersson LI. Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analog imprinting strategy, *J. Org. Chem.* 1990; 55 (10): 3381-3383.

Sellergren B. Molecular imprinting by noncovalent interactions. Enantioselectivity and binding capacity of polymers prepared under conditions favoring the formation of template complexes. *Makromol. Chem.* 1989; 190 (11): 2703-2711.

Sellergren B. *Molecularly Imprinted Polymers: Man Made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry*. 1^a ed. Amsterdam: Elsevier; 2001.

Sellergren B. *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*. Amsterdam. Holanda: Elsevier; 2001.

Sneschkoff N, Crabb K, BelBruno JJ. An improved molecularly imprinted polymer film for recognition of amino acids. *J. Appl. Polym. Sci.* 2002; 86 (14): 3611-3615.

Staffilani M, Hancock KSB, Steed JW, Holman KT, Atwood JL, Juneja RK. Anion binding within the cavity of π -metalated calixarenes. *J. Am. Chem. Soc.* 1997; 119 (27): 6324-6335.

Steed JW, Turner DR, Wallace KJ. *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*. West Sussex, England: John Wiley And Sons; 2007.

Steed JW, Turner DR, Wallace KJ. *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*. John Wiley And Sons. West Sussex: England; 2007.

Steed JW, Turner DR, Wallace KJ. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*. J. Wiley & Sons: Chichester; 2007.

Steed JW. A modular approach to anion binding podands: adaptability in design and synthesis leads to adaptability in properties. *Chem. Commun.* 2006; 25: 2637-2649.

Stevenson D. Molecular imprinted polymers for solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.* 1999; 18 (3): 154-158.

Subrahmanyam S, Piletsky SA, Piletska EV, Chen BN, Karim K, Turner APF. "Bite-and-Switch" approach using computationally designed molecularly imprinted polymers for sensing of creatinine. *Biosens. Bioelectron.* 2001; 16 (1-2): 631-637.

Suedee R. The Use of Molecularly Imprinted Polymers for Dermal Drug Delivery. *Pharm Anal Acta*. 2013; 4 (8): 2153-2435.

Szalewick K, Patkowski K, Jeziorski B. Intermolecular Interactions via Perturbation Theory: From Diatoms to Biomolecules. *Struct. Bonding*. 2005; 116: 43-117.

Takagishi T, Klotz IM. Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. *Biopolymers*. 1972; 11(2): 483-491.

Takeba K, Fujinuma K, Miyazaki T, Nakazawa H. Simultaneous determination of β -lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1998; 812: 205-211.

Tamayo FG; Turiel E; Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *J. Chromatogr. A*. 2007; 1152: 32-40.

Van Benthem K, Tan G, French RH, DeNoyer LK, Podgornik R, Parsegian VA. Graded interface models for more accurate determination of van der Waals–London dispersion interactions across grain boundaries. *Phys. Rev.* 2006; 74 (20): 205110-205122.

Verdon E, Couëdor P. Multiresidue analytical method for the determination of eight penicillin antibiotics in muscle tissue by ion-pair reversed-phase HPLC after precolumn derivatization. *J. AOAC Int.* 1999; 82 (5): 1083-1095.

Whitcombe MJ, Rodriguez ME, Villar P, Vulfson EN. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol, *J. Am. Chem. Soc.* 1995; 117 (27): 7105-7111.

Wulff G, Sarhan A. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angew. Chem., Intl. Ed.* 1972; 11 (4): 341.

Wulff G, Vesper R, Grobe-Einsler R, Sarhan A. Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. *Makromol. Chem.* 1977; 178 (10): 2799-2816.