

FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN QUÍMICA



Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Empleo de la técnica de RMN de sólidos para la determinación estructural de polímeros impresos de huella molecular.

Emprego da técnica de RMN de sólidos para a determinación estrutural de polímeros pegada molecular.

Use of the solid NMR technique for the structural determination of molecularly imprinted polymers.

Directores:

- José M. López Vilariño
- Roberto Herrero Rodríguez

Alejandra Sabín López

Curso: 2016/2017 – Convocatoria: Junio

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 5 |
| RESUMO..... | 7 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| CRONOGRAMA..... | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| 1.1. Problemática existente con residuos farmacéuticos en el medio ambiente..... | 12 |
| 1.2. Polímeros impresos de huella molecular (MIP)..... | 13 |
| 1.2.1. Composición de un polímero impreso de huella molecular..... | 14 |
| 1.2.2. Tipos de interacciones..... | 15 |
| 1.3. Cálculo pre – polimerización..... | 17 |
| 1.4. Resonancia magnética nuclear (RMN) para la validación del cálculo computacional..... | 18 |
| 1.4.1. Resonancia magnética nuclear de giro al ángulo mágico de alta resolución (RMN HR-MAS)..... | 18 |
| 2. OBJETIVOS..... | 22 |
| 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL..... | 24 |
| 3.1. Identificación de las moléculas a estudiar..... | 24 |
| 3.2. Cálculo computacional..... | 26 |
| 3.3. Obtención de espectros de RMN – ^1H | 30 |
| 3.4. Síntesis del polímero impreso..... | 33 |
| 3.5. Obtención de espectros de RMN HR-MAS..... | 35 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 37 |
| 4.1. Cálculo pre – polimerización..... | 37 |
| 4.2. Obtención de espectros de RMN – ^1H para la validación del cálculo computacional..... | 44 |
| 4.3. Síntesis del polímero impreso mediante la polimerización en polvo..... | 55 |
| 4.4. Obtención de espectros de RMN HR-MAS para la caracterización del polímero..... | 56 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 62 |

| | |
|----------------------|----|
| 6. CONCLUSIÓNS..... | 63 |
| 7. CONCLUSIONS..... | 64 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 65 |

RESUMEN

En los últimos años ha surgido una notable preocupación, a la que cada vez se le da mayor importancia, por los efectos que causan en el medio ambiente los medicamentos que son consumidos o restos de medicamentos no utilizados. El motivo de esta preocupación es la presencia de determinadas sustancias que provienen de los medicamentos en las aguas naturales y en los seres vivos que las habitan. Debido a que los efectos de éstos compuestos se producen incluso a concentraciones a nivel de trazas, la detección y cuantificación de éstos contaminantes emergentes supone un problema. Para alcanzar unos niveles de detección adecuados es preciso el empleo de técnicas de pre-concentración, que permitan la posterior determinación y por ello en este trabajo se propone una alternativa basada en el uso de polímeros impresos de huella molecular para llevar a cabo estas operaciones.

El interés existente a los polímeros impresos de huella molecular (MIPs) es debido a que es posible realizar una síntesis a medida y gracias a ello es posible dotar a éstos de la capacidad de adsorber específicamente una sustancia (analito) de interés, siendo por ello especialmente útiles en las etapas de pre-concentración y limpieza de muestra.

La dificultad que se nos presenta es, que el desarrollo de un polímero de impresión molecular (MIP) ideal para un analito determinado, con propiedades específicas y selectivas hacia ese compuesto, es un proceso complejo. Esto es porque implica optimizar las condiciones de síntesis, la selección de un monómero y entrecruzador adecuados y establecer la estequiometría de reacción de ambos. Si este proceso se lleva a cabo mediante procedimientos de ensayo y error en el laboratorio, se emplea una gran cantidad de tiempo y trabajo. Por ello se están empezando a realizar avances en el desarrollo de métodos computacionales que ahorran tiempo y empleo de reactivos. Estas técnicas se basan en la mecánica cuántica y la química computacional y consiguen, en base a simulaciones dinámicas, combinaciones que permiten discriminar una gran cantidad de ensayos. Son capaces de estudiar el comportamiento cuántico de miles de moléculas a la vez y buscar las formulaciones más adecuadas para realizar la síntesis del material deseado, lo que permite el diseño de materiales con propiedades idóneas para la finalidad que se persigue.

La enorme evolución de los métodos computacionales reduce parte del trabajo del laboratorio mediante los ensayos virtuales, mucho más rápidos y económicos. Estos finalmente, proponen unos pocos sistemas con los que trabajar de manera tradicional y así de forma empírica evaluar cuál es el que ofrece los mejores resultados.

En este trabajo se realizarán una serie de experimentos de cálculo para optimizar la selección de compuestos de reacción y su estequiometría y se realizará un seguimiento del proceso hasta la etapa de polimerización que se caracterizará mediante técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear, empleando para ello la RMN HR-MAS (solid-state cross-polarization/magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy). Con la obtención de los diferentes espectros de RMN se podrá identificar como son las interacciones entre los componentes de los polímeros de impresión molecular y validar en la práctica el cálculo computacional previamente realizado.

RESUMO

Nos últimos anos houbo unha preocupación significativa, á que cada vez se lle da maior importancia, polos efectos que causan sobre o medio ambiente os medicamentos que son consumidos ou restos dos medicamentos non utilizados. A razón desta preocupación é a presenza de certas substancias que veñen dos medicamentos en augas naturais e as criaturas que as habitan. Xa que os efectos destes compostos poden ocorrer mesmo en concentracións en cantidades trazas, a detección e cuantificación destas contaminantes emerxentes é un problema. Para acadar niveis axeitados de detección requírese a utilización de técnicas de pre-concentración, permitindo a determinación posterior e, por conseguinte, neste traballo preséntase unha alternativa con base na utilización de polímeros de pegada molecular para efectuar estas operacións.

Como é posible facer unha síntese a medida dos polímeros impresos de pegada molecular (MIPs), é posible proporcionarlles a capacidade de adsorber especificamente a unha substancia (analito) de interese, sendo así útil nos pasos de limpeza e de pre-concentración da mostra.

A dificultade é que o desenvolvemento dun polímero de pegada molecular (MIP) ideal para un analito particular con propiedades específicas e selectivas para as propiedades do composto, é un proceso complexo. Isto é porque implica a optimización das condicións de síntese, a selección dun axente de reticulación e monómero axeitado e establecer a estequiometría da reacción de ambos. Se este proceso realízase por medio de procedementos de intento e erro no laboratorio, usarase unha morea de tempo e traballo. Polo tanto, estanse empezando a facer avances no desenvolvemento de métodos computacionais que economizan tempo e uso de reactivos. Esta técnica baséase na mecánica cuántica e química computacional e consegue, a partir de simulacións dinámicas, combinacións que permiten a discriminación dun gran número de ensaios. Son capaces de estudar o comportamento cuántico de miles de moléculas dunha soa vez e atopar o máis adecuado para a síntese das formulacións dos materiais desexados, permitindo o desenvolvemento destes coas propiedades adecuadas para a finalidade pretendida.

O enorme desenvolvemento de métodos computacionais reduce en gran medida o traballo de laboratorio mediante os moito máis rápidos e máis baratos ensaios virtuais. Estes, finalmente, propoñer algúns sistemas que funcionan de forma tradicional e, polo tanto, empiricamente avaliar cal deles ofrece os mellores resultados.

Neste estudo, unha serie de experiencias de cálculo será executada para optimizar a selección de compostos de reacción e a súa estequiometría, e seguir o proceso realizado ata a fase de polimerización que caracterízase por técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear, empregando o HR-MAS RMN (Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de estado sólido de polarización cruzada / rotación ao ángulo máxico). A través da obtención de varios espectros de RMN, poden ser identificadas as interaccións entre os compoñentes de polímeros de pegada molecular e validar na práctica o cálculo computacional feito.

ABSTRACT

In recent years, there has been a notable concern, which is increasingly given importance, due to the effects on the environment of medicines that are consumed or remains of unused medicines. The reason for this concern is the presence of certain substances that come from the medicines in the natural waters and in the living beings that inhabit them. Because the effects of these compounds occur even at trace level concentrations, the detection and quantification of these emerging pollutants is a problem. In order to achieve adequate levels of detection, it is necessary to use pre-concentration techniques, which allow the subsequent determination and therefore in this work, an alternative based on the use of molecularly imprinted polymers is proposed to carry out these operations.

The interest in molecular imprinted polymers (MIPs) is due to the fact that it is possible to carry out a customized synthesis and, as a result, it is possible to give them the ability to specifically adsorb a substance (analyte) of interest, especially useful in the pre-concentration and sample clean-up steps.

The difficulty presented to us is that the development of an ideal molecular imprinted polymer (MIP) for a given analyte with specific and selective properties towards that compound is a complex process. This is because it involves optimizing the synthesis conditions, selecting a suitable monomer and crosslinker and establishing the reaction stoichiometry of both. If this process is carried out by trial and error procedures in the laboratory, a great deal of time and labor is employed. Therefore, advances are being made in the development of computational methods that save time and use of reagents. These techniques are based on quantum mechanics and computational chemistry and achieve, based on dynamic simulations, combinations that allow discriminating a large number of tests. They are able to study the quantum behavior of thousands of molecules at a time and look for the most appropriate formulations to perform the synthesis of the desired material, which allows the design of materials with properties suitable for the purpose being pursued.

The enormous evolution of computational methods reduces part of the work of the laboratory through virtual tests, faster and cheaper. These finally propose a few

systems with which to work in a traditional way and thus empirically evaluate which one offers the best result.

In this work, a series of calculation experiments will be carried out to optimize the selection of reaction compounds and their stoichiometry and the process will be monitored until the polymerization stage, which will be characterized by techniques of nuclear magnetic resonance spectroscopy, using HR-MAS NMR (solid-state cross-polarization / magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy). With the obtaining of the different NMR spectra, it will be possible to identify the interactions between the components of the molecular imprinted polymers and validate in practice the computation analysis previously performed.

CRONOGRAMA

| Actividad | Búsqueda bibliográfica | Cálculo computacional | Obtención de espectros RMN- ¹ H | Síntesis MIP y NIP | Obtención de espectros RMN HR-MAS | |
|-----------|------------------------|-----------------------|--|--------------------|-----------------------------------|--|
| Día 1 | | | | | | |
| Día 2 | | | | | | |
| Día 3 | | | | | | |
| Día 4 | | | | | | |
| Día 5 | | | | | | |
| Día 6 | | | | | | |
| Día 7 | | | | | | |
| Día 8 | | | | | | |
| Día 9 | | | | | | |
| Día 10 | | | | | | |
| Día 11 | | | | | | |
| Día 12 | | | | | | |
| Día 13 | | | | | | |
| Día 14 | | | | | | |
| Día 15 | | | | | | |
| Día 16 | | | | | | |
| Día 17 | | | | | | |
| Día 18 | | | | | | |
| Día 19 | | | | | | |
| Día 20 | | | | | | |
| Día 21 | | | | | | |
| Día 22 | | | | | | |
| Día 23 | | | | | | |
| Día 24 | | | | | | |
| Día 25 | | | | | | |
| Día 26 | | | | | | |
| Día 27 | | | | | | |
| Día 28 | | | | | | |
| Día 29 | | | | | | |
| Día 30 | | | | | | |
| Día 31 | | | | | | |
| Día 32 | | | | | | |
| Día 33 | | | | | | |
| Día 34 | | | | | | |
| Día 35 | | | | | | |
| Día 36 | | | | | | |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática existente con residuos farmacéuticos en el medio ambiente

En la actualidad existe una emergente preocupación debido a la contaminación que producen los residuos de medicamentos, consumidos por los seres humanos, en los cursos fluviales. En el medio ambiente se observa que esta contaminación es producida por una amplia variedad de tipos de medicamentos: antibióticos, analgésicos, anticancerosos, ansiolíticos, antisépticos e incluso hormonas. Aunque se podría realizar un estudio para un interminable número de medicamentos, nuestro trabajo se centrará en dos tipos, que fueron elegidos por el interés existente en ellos tanto como contaminantes emergentes, como por su incremento en el consumo: los antiinflamatorios no esteroideos: ibuprofeno, indometacina, diclofenaco, etc. y las benzodiazepinas como diazepam y lorazepam.

Todos estos medicamentos, una vez que son ingeridos por el ser humano, pueden metabolizarse mediante diferentes enzimas o bien eliminarse del organismo sin ser metabolizados. Los residuos de los medicamentos se expulsan del organismo a través de la orina y termina contaminando las aguas. Este tipo de aguas son descontaminadas en plantas de tratamiento de aguas residuales, pero los restos de medicamentos no se consiguen eliminar por los procesos habituales que se llevan a cabo en estas instalaciones. La razón por lo cual no se consiguen eliminar los residuos de los medicamentos en estas plantas de tratamiento, es debido a que, a pesar de que estos compuestos son de naturaleza orgánica, tienen grupos funcionales que les proporcionan cierta solubilidad en agua y, al encontrarse disueltos, se dificulta su proceso de descontaminación.¹

Una vez que las aguas son tratadas en estas plantas se liberan a los cursos fluviales. Como los restos de los medicamentos no se han podido eliminar, contaminarán las aguas de los ríos, donde existe una gran cantidad de organismos acuáticos y que pueden verse afectados por la contaminación, incorporando los restos de los medicamentos a su organismo. A su vez, los seres humanos podrán añadir estos organismos contaminados por medio de la cadena alimentaria. Todavía no se conoce

hasta qué punto pueden ser dañinos para los seres humanos, pero observando los resultados que se obtienen cuando se estudian sus efectos en animales o plantas surge la preocupación. Además es necesario comenzar a darle la importancia que se merece a esta problemática debido a que los residuos de los medicamentos afectan de manera perdurable en el medio ambiente.²

1.2. Polímeros impresos de huella molecular (MIP)

Para solucionar el problema de la detección y cuantificación de los residuos de los contaminantes se recurrirá al uso de los polímeros impresos de huella molecular, que son materiales que nos permiten reconocer selectiva y específicamente analitos de nuestro interés a concentraciones incluso a niveles traza. Los polímeros impresos de huella molecular son materiales diseñados para reconocer y enlazarse selectivamente a un analito de interés, que se conoce como template o molécula plantilla, a partir del cual se diseña el MIP. Además, sirven para el reconocimiento de moléculas con estructuras similares a las de la molécula plantilla que se ha usado en la síntesis del polímero.³

La impresión molecular es una técnica útil para la preparación de materiales funcionales con propiedades de reconocimiento molecular. Se utilizan materiales con impresiones moleculares en diversas aplicaciones, tales como fase estacionaria cromatográfica, análisis de inmunoensayo y tecnologías de sensores. Por ello los polímeros con impresión molecular (MIP) se han convertido en un campo de estudio cada vez más activo para la construcción de nuevos materiales capaces de reconocimiento molecular.

El primer paso de la síntesis del MIP, consiste en seleccionar la molécula plantilla a partir de la cual vamos a crear el polímero, bien para su detección posteriormente o para el estudio de otras moléculas que sean similares. Lo primero que se forman son los enlaces entre esta molécula y el número de moléculas de monómero funcional necesarias. Para ello se selecciona, como monómero funcional, un compuesto que tenga grupos funcionales complementarios a la molécula plantilla. De esta forma se consiguen formar enlaces fuertes que generan un buen complejo template-monómero. Esta etapa será determinante para que, posteriormente, nuestro polímero impreso

trabaje de manera adecuada, esto es debido a que cuanto mayor sea la energía de enlace, se conseguirán uniones más fuertes y porque cuanto mayor sea el número de enlaces que tenemos, la unión será más específica. Estos enlaces generados se bloquean mediante la adición del entrecruzador, que provoca la polimerización. Para la realización de todos estos pasos es preciso encontrar un disolvente adecuado para todas las moléculas que entran en juego en la reacción. Como la finalidad de la síntesis del MIP se basa en conseguir una estructura que contenga los huecos complementarios, en tamaño, forma y funcionalidad, al analito que se quiere determinar, el último paso de la síntesis consiste en la eliminación del template usando para ello un disolvente de polaridad superior a la del disolvente en el cual tiene lugar la polimerización. De esta forma se crea el polímero que contiene las cavidades necesarias para actuar como receptor de nuestra molécula de interés.

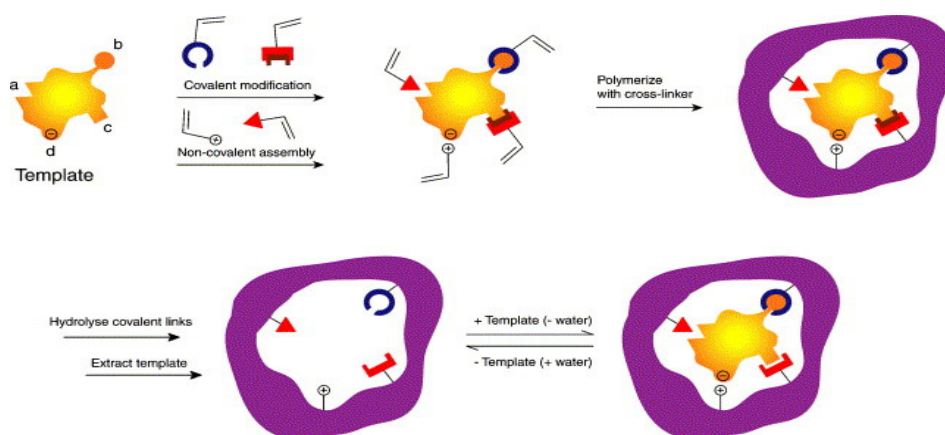


Figura 1: Proceso de síntesis de polímeros de impresión molecular (MIPs). Fuente [4].

1.2.1. Composición de un polímero impreso de huella molecular

La elección de la molécula plantilla o template que utilizar en la síntesis del MIP se encuentra condicionada por diferentes factores.

Normalmente se utilizará el mismo analito que posteriormente se quiere identificar en una muestra pero a veces se utiliza una molécula de estructura similar (“mimic templates”). El porqué del uso de otra molécula diferente a la que se quiere estudiar puede ser debido a que nuestro analito no es estable en las condiciones de

polimerización, no es soluble en el disolvente que requiere la síntesis o el analito se encuentra a niveles traza en la muestra (la eliminación de la molécula plantilla no siempre se logra completamente y produciría interferencias).

La elección del monómero se hace en función de la molécula plantilla deseada. Se escogerán moléculas con grupos funcionales complementarios. Se utiliza un exceso de monómero-plantilla debido a que los equilibrios de formación tienen constantes con valores muy bajos y se necesita desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo.⁵

Al complejo monómero – plantilla se añade un entrecruzador de reacción. Este componente tiene la función de formar la red del polímero, por ello es muy importante la cantidad que se añade, un defecto provoca una baja estabilidad y poco reconocimiento molecular, y un exceso provocaría una elevada rigidez impidiendo el acceso a los sitios creados. Con respecto al complejo monómero-plantilla, se añade un exceso de entrecruzador, siendo una relación habitual la de Plantilla: Monómero: Entrecruzador- 1:4:20.⁶

Para que la reacción de polimerización tenga lugar es necesario el uso de un iniciador radicalario. Generalmente se usa AIBN ((Azobisisobutironitrilo), ya que, a la temperatura adecuada y reposando durante el tiempo necesario, alcanza una velocidad de formación de radicales adecuada para la polimerización.

La adecuada elección del disolvente (su volumen o características de su naturaleza) es uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta. La polaridad de este debe permitir al monómero y a la molécula plantilla formar enlaces entre ellos y no favorecer la formación de enlaces de estas especies con el disolvente, ya que no se produciría el proceso de impresión.

1.2.2. Tipos de interacciones

Como cualquier otro tipo de tecnología, la síntesis de polímeros impresos de huella molecular, requiere que las estructuras que sinteticemos tengan un elevado rendimiento. En el caso de los MIPs, un buen rendimiento se refiere a diseñar un sistema de polimerización con elevada selectividad y afinidad. Suponemos que una

elevada selectividad está ligada a un complejo molécula plantilla- monómero(s) muy estable y muy fuerte. Existen dos tipos de interacciones que caracterizarán la impresión molecular y que se generan entre la molécula plantilla y el monómero funcional. Estas pueden ser covalentes o no covalentes. Ambas presentan una serie de ventajas e inconvenientes que se presentan a continuación:

- Enlaces covalentes

En este tipo de interacciones se encuentran sitios de enlace, creados entre monómero y plantilla, muy homogéneos y muy bien definidos. Esto se presenta como una ventaja, ya que la selectividad, por tanto, es muy elevada. A pesar de tener una afinidad por los analitos de interés muy alta, la cinética es muy lenta. Que la afinidad entre la molécula plantilla y el monómero sea tan alta presenta problemas a la hora de la eliminación de esta molécula. La cinética lenta que conlleva este tipo de polimerización resulta un inconveniente, pues el tiempo de contacto necesario entre la muestra y el polímero es elevado.

- Enlaces no covalentes

Las interacciones de este tipo son las más comúnmente utilizadas ya que presentan más ventajas que inconvenientes, por lo que se trata del tipo de polimerización más favorable. Las uniones se realizan mediante enlaces de hidrógeno, interacciones tipo dipolo-dipolo, iónicas, hidrofóbicas o $\pi - \pi$. En comparación con las anteriores se puede decir que los sitios creados son menos homogéneos, pero a pesar de esto presentan una elevada selectividad por el analito de interés. Además, la cinética será mucho más favorable que en el caso anterior y la eliminación de la molécula plantilla será mucho menos costosa.

Que actualmente exista una gran variedad de monómeros funcionales nos permite poder diseñar MIPs para una elevada cantidad de compuestos químicos. A pesar de esta gran ventaja, la existencia de tantas posibilidades se nos plantea como un problema cuando muchas de estas posibles síntesis no dan los resultados necesarios para que el MIP sea específico y trabaje correctamente. Por todo esto en este estudio se utilizarán sistemas de cálculo computacional con los que, mediante simulaciones

por ordenador, se observarán como son las interacciones entre una molécula plantilla y un monómero, o varios, que previamente se ha seleccionado para crear el MIP y de esta forma se dispone de mayor información previa sobre su funcionamiento lo que permite dirigir los experimentos hacia aquellas interacciones que, en principio, parecen conducir a los mejores resultados.

1.3. Cálculo pre – polimerización

Si a la hora de realizar la síntesis de un polímero impreso ideal se parte de la combinación de 5 templates, con 5 monómeros funcionales y a su vez 5 entrecruzadores, se llegan a tener 125 posibles experiencias que llevar a cabo. Tener tantas opciones se convierte en un problema a la hora de realizar ensayos experimentales hasta conseguir un MIP con las características adecuadas. Además, se debe pensar que esta tarea se complica todavía más si se tiene en cuenta que se pueden usar mezclas de monómeros en diferentes proporciones (estequiometría de reacción), lo que aumenta el número de combinaciones de síntesis de MIPs.

Si se llevasen a cabo en el laboratorio todas las experiencias que se sospechan que pueden dar buenos complejos molécula plantilla- monómero(s), ésto supondría un coste muy elevado, y generaría demasiados residuos que, trabajando con algunos compuestos que se usan para estas síntesis y que presentan toxicidad, provocaría un gran problema.

El cálculo computacional nos soluciona este problema. Mediante una serie de programas informáticos, que más adelante se enumerarán y describirán, se consigue estudiar, mediante una simulación, el comportamiento que tendría nuestro MIP. Para realizar la simulación se parte de la suposición de que el complejo monómero-template que se forma al poner en contacto estas dos especies, se mantiene y sobrevive en las siguientes etapas de la polimerización (al añadir el entrecruzador). Ocurriendo esto, solamente se debe estudiar el modelo virtual de este complejo y sus interacciones, en lugar de tener que trabajar con todo el polímero. Así se simplifica significativamente la simulación y su complejidad.⁷

Mediante un programa informático se representa la situación que se alcanzaría al poner en contacto la molécula plantilla elegida y un elevado número de moléculas del

monómero funcional seleccionado, que se representa en lo que se denomina caja virtual. Se puede estudiar cual es el número de monómeros que se unirían a nuestra plantilla y, por tanto, cual es nuestro complejo plantilla-monómero(s). Además, se observa perfectamente a través de que átomos se producen los enlaces, incluso es posible el cálculo de sus distancias y energías de enlace.

Para comprobar empíricamente las posibles interacciones plantilla-monómero que nos ofrecen como resultado las simulaciones por ordenador se usará en este trabajo el análisis mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

1.4. Resonancia magnética nuclear (RMN) para la validación del cálculo computacional

A través de la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear se puede conseguir la caracterización de los polímeros sintetizados. Realizando una comparativa entre los espectros de muestras estándar de las moléculas plantilla y de los monómeros usados en la síntesis, y los espectros de los complejos monómero-plantilla en disolución, se podrá determinar cómo y entre que átomos se realizan las interacciones, estudiando los desplazamientos que sufren las señales de unos espectros con respecto a los otros. Además, se puede determinar la estequiometría llevando a cabo la obtención de espectros de RMN en diferentes proporciones plantilla-monómero. A partir de los resultados que se obtienen con los espectros se puede confirmar lo que se habría predicho con ayuda del cálculo computacional y de este modo validar la metodología de trabajo.

1.4.1. Resonancia magnética nuclear de giro al ángulo mágico de alta resolución (RMN HR-MAS)

La aplicación del RMN a muestras en estado sólido fue mucho más tardía que su uso en muestras líquidas o gaseosas.⁸

Como se puede observar en la Figura 2, existen diferencias apreciables entre los espectros de RMN de una muestra líquida y de una muestra sólida. En un espectro de una disolución se tienen señales muy estrechas y bien resueltas. Mientras que en un sólido se producen señales muy anchas, y este ensanchamiento implicaría pérdida

de sensibilidad.

La diferencia en la forma de los espectros de sólidos y líquidos proviene de la diferente movilidad de las moléculas. Los sólidos presentan una baja movilidad mientras que los líquidos o gases presentan una alta movilidad de rotación y traslación. La rápida reorientación de las moléculas permite promediar las interacciones anisótropas. En el caso de los sólidos los ensanchamientos que se producen pueden ser tan grandes que las señales ocupen todo un espectro. Por tanto, la obtención de espectros de alta resolución de sólidos exige la aplicación de técnicas especiales.⁹

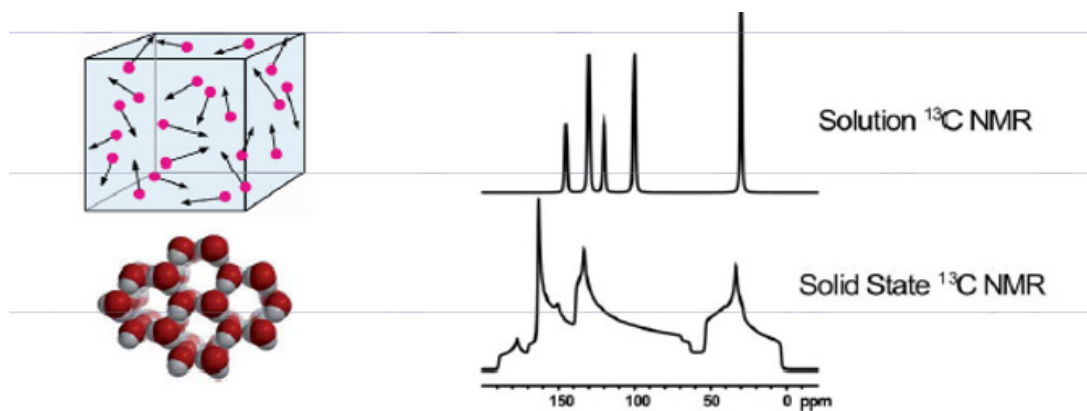


Figura 2: Diferencias entre un espectro de RMN de líquidos frente a uno de sólidos. Fuente [10].

Las principales diferencias en los anchos de bandas pueden ser causadas por el promedio imperfecto de las interacciones (entre los momentos magnéticos nucleares y el campo magnético) de estado sólido (anisotropía del cambio químico y acoplamiento dipolar) o movilidad molecular reducida.

En la técnica de RMN existen varios tipos de interacciones, y todas ellas poseen dos tipos de componentes; uno isotrópico (que no depende de la orientación del campo magnético) y otro anisotrópico (que depende de la orientación del campo magnético). Si la atención se centra en la componente anisotrópica, sus interacciones dependerán de la expresión $3\cos^2\theta - 1$. Donde θ es el ángulo que forma el vector que une los núcleos con el campo magnético.

El ensanchamiento de señales se puede reducir rotando la muestra a un ángulo de $54^\circ 44'$ (ángulo mágico, figuras 3 y 4), que hace que el término angular

$3\cos^2\theta - 1$ se promedie a cero.

Por tanto, si el ángulo θ se elige de tal modo que $3\cos^2\theta - 1 = 0 \rightarrow \theta = 54^\circ 44'$, todas las interacciones que dependan de la expresión $3\cos^2\theta - 1$ se anulan. Este ángulo es el que da nombre a este tipo de experiencias, RMN HR-MAS (Resonancia magnética nuclear bajo ángulo mágico).¹¹

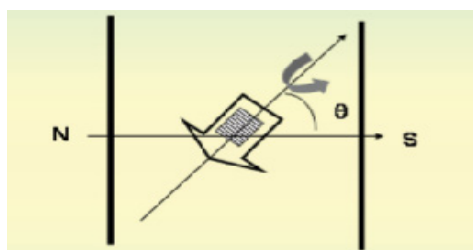


Figura 3 Representación esquemática de la disposición experimental para el giro de la muestra. En MAS, $\theta = 54^\circ 44'$. Fuente [12]

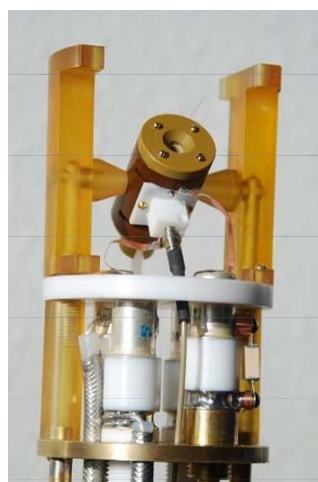


Figura 4: Equipo para la colocación de una muestra bajo ángulo mágico. Fuente [10].

La resonancia magnética nuclear bajo ángulo mágico nos proporciona ahora los medios para estudiar las estructuras, reacciones e interacciones que se producen en muestras que no se alteran de su hábitat natural. La técnica recientemente desarrollada de HR-MAS permite el análisis de materiales incluso cuando todavía existen algunos sólidos. La técnica se realiza utilizando una sonda especializada montada en un instrumento RMN de estado líquido. Las interacciones dipolares que son predominantes en los componentes superficiales en el estado sólido se disminuyen mediante la adición de disolvente y se promedian girando la muestra.¹³

El efecto de la anisotropía del desplazamiento químico en la forma de los espectros de RMN se puede observar en la Figura 5. Lo que se quiere conseguir al rotar una muestra policristalina es eliminar la anisotropía de desplazamiento químico (CSA

“chemical shift anisotropy”). Así pues, si la velocidad de rotación es suficientemente rápida comparada con la anisotropía de la interacción, ésta se promedia a cero.

Como se observa en la figura 5, a medida que la velocidad de giro disminuye, el espectro contiene lo que se denominan bandas de rotación. La señal isotrópica se identifica por ser la única línea que no modifica su posición cuando se varía la velocidad de giro de la muestra. En el momento en el cual se realiza un experimento y se pone una muestra a girar, sus cristales se orientan, y por lo tanto los valores del CSA de todos los cristalitas se hacen dependientes del tiempo. Para que el giro al ángulo mágico reduzca un espectro de una muestra en polvo a una única línea al desplazamiento químico isotrópico, la velocidad de giro de la muestra debe ser rápida comparada con la interacción anisotrópica.

Hay que destacar que la anisotropía de desplazamiento químico en unidades de frecuencia es proporcional a B_0 y, por lo tanto, al trabajar a campos mayores, se hace más difícil eliminar esta anisotropía (se requieren mayores velocidades de giro).¹⁴

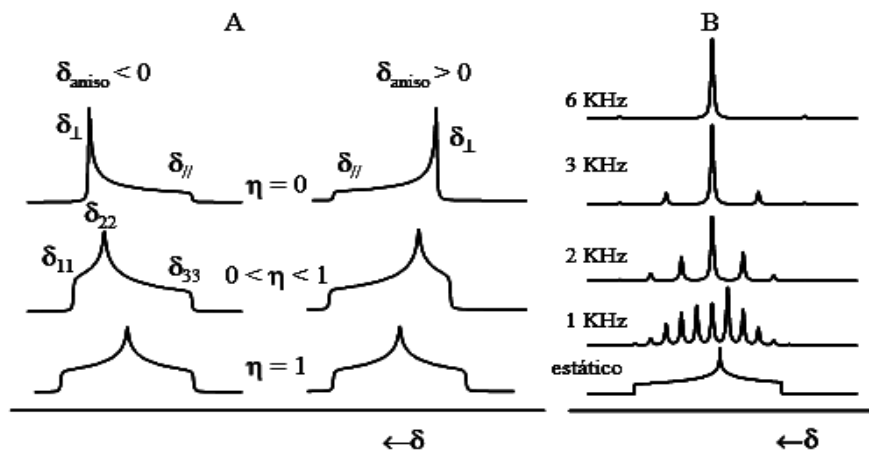


Figura 5: Efecto de la anisotropía del desplazamiento químico en la forma de los espectros de RMN de muestras en polvo: A) en estático, y B) girando al ángulo mágico a distintas velocidades. Fuente: [15].

En el caso concreto de los MIPs al poner en contacto la disolución monómero-plantilla con nuestro entrecruzador, comienza la síntesis y, nuestro MIP polimeriza. Se tiene una sustancia que se define como sólido blando y que se necesita caracterizar por

esta técnica. Los polímeros son estructuras altamente amorfas y heterogéneas que producirán señales en los espectros de RMN de gran amplitud o incluso de superposición. A diferencia de la RMN para disoluciones, la RMN para estado sólido sirve para la caracterización del propio polímero.

Tal y como se ha indicado, el empleo de la técnica de giro al ángulo mágico, se consigue reducir el ensanchamiento de las señales que producen los polímeros en RMN, al promediarse perfectamente las interacciones que existen en estado sólido y que se presentaban como un problema a la hora de poder interpretar los espectros de los MIPs.

2. OBJETIVOS

En este trabajo el objetivo principal que se pretende es la síntesis de un polímero impreso de huella molecular capaz de adsorber específicamente las moléculas, principios activos de determinados medicamentos (Paracetamol, Ibuprofeno, Indometacina, Diclofenaco, Lorazepam, Diazepam) que se plantean para este estudio. Además, con el fin de alcanzar este objetivo principal, se necesitan conseguir los siguientes objetivos secundarios:

- i. Estudiar mediante técnicas virtuales la etapa de pre polimerización para así determinar la composición que debe presentar nuestro MIP y su estequiometría de reacción.
- ii. Sintetizar los MIP y el polímero no impreso de huella molecular (NIP) calculados para validar su comportamiento.
- iii. Caracterizar el MIP y NIP para determinar su estructura y de ese modo conocer si las aproximaciones realizadas mediante cálculo computacional han sido correctas.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

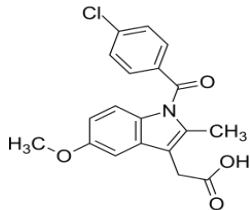
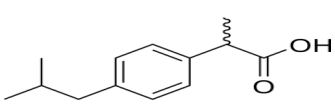
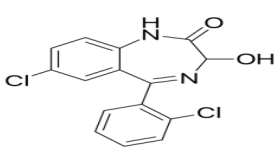
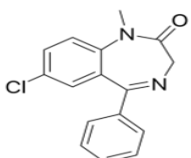
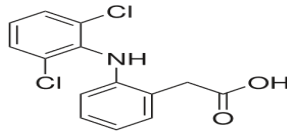
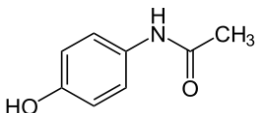
3.1. Identificación de las moléculas a estudiar

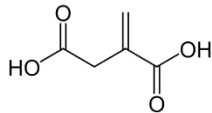
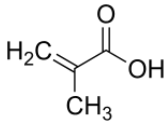
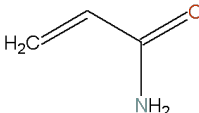
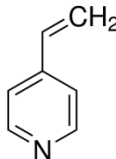
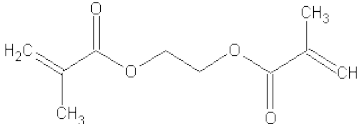
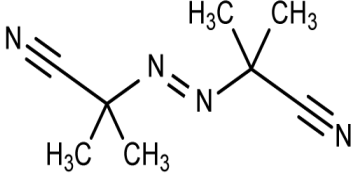
Mediante el uso de la tecnología de impresión molecular se propone el estudio de la Indometacina, el Ibuprofeno, el Diclofenaco, el Lorazepam, el Diazepam y el Paracetamol.

Estas moléculas plantilla se ensayan enfrentándolas a monómeros como el Ácido itacónico, el Ácido metacrílico, la 4-Vinilpiridina y la Acrilamida.

A continuación se presentan las estructuras de las moléculas con las que se realizará el trabajo:

Tabla I Identificación de las moléculas a estudiar.

| FUNCIÓN | NOMBRE | ESTRUCTURA |
|--------------------|--------------|---|
| MOLÉCULA PLANTILLA | INDOMETACINA |  |
| | IBUPROFENO |  |
| | LORAZEPAM |  |
| | DIAZEPAM |  |
| | DICLOFENACO |  |
| | PARACETAMOL |  |

| FUNCIÓN | NOMBRE | ESTRUCTURA |
|---------------|-------------------|---|
| MONÓMERO | ÁCIDO ITACÓNICO |  |
| | ÁCIDO METACRÍLICO |  |
| | ACRILAMIDA |  |
| | 4-VINILPIRIDINA |  |
| ENTRECRUZADOR | EGDMA |  |
| INICIADOR | AIBN |  |

3.2. [Cálculo computacional](#)

Para la realización del cálculo computacional se emplearán los programas que se presentan en la siguiente lista:

Tabla II Identificación de los programas usados en el cálculo computacional.

| Software | Aplicación |
|---------------------------------|---|
| Chemspider.com | Base de datos que proporciona archivos en formato .mol de estructuras moleculares. |
| Zinc.docking.org | Base de datos que proporciona archivos en formato .mol de estructuras moleculares. |
| UCSF Chimera 1.10.2 | Programa de diseño de estructuras, visualización de moléculas, enlaces entre ellas y disposición espacial de mínima energía que son capaces de adoptar. |
| PyMol molecular graphics system | Programa de visualización de estructuras, enlaces entre ellas y disposición espacial de mínima energía que son capaces de adoptar. |
| Acpype | Software para creación de archivos de texto con información acerca de tipo de átomos, enlaces y disposición espacial de una determinada molécula. |
| Gromacs | Software para modelización molecular a partir de archivos de texto proporcionados por Chemspider y Acpype. |
| AutoDock Tools | Software para análisis de energías de enlace en mezclas de pre – polimerización. |

Lo primero que se lleva a cabo a la hora de comenzar la modelización computacional es descargar las diferentes moléculas de interés mediante programas como Chemspider (Chemspider.com) o Zinc.docking.org, o diseñar a mano las moléculas deseadas con ayuda de UCSF Chimera 1.10.2.

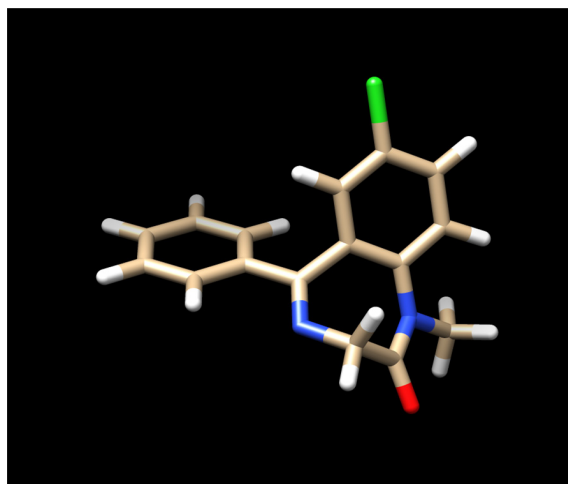


Figura 6: Molécula de Diazepam. Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

Lo siguiente que se debe hacer es llevar las moléculas a su posición de mínima energía y para ello se utilizan programas como PyMol molecular graphics system, que sirve para visualizar las estructuras y la disposición espacial de mínima energía que son capaces de adoptar, y se crean archivos Acyppe, que contienen información sobre los tipos de átomos, enlaces, y la disposición espacial de la molécula, que posteriormente se utilizarán para analizar la uniones por puentes de hidrógeno de las moléculas seleccionadas.

Mediante los programas Gromacs, AutoDock Tools y UCSF Chimera 1.10.2, se realiza el estudio de las uniones por puentes de hidrógeno. Con ayuda de este último programa se consigue visualizar la disposición que adoptarían la molécula plantilla y monómero al ponerse ambos en contacto. Se observa si son moléculas susceptibles de formar enlaces de hidrógeno o si, por su disposición, el ángulo y la distancia que se necesitaría para formar el enlace no permite formar este enlace.

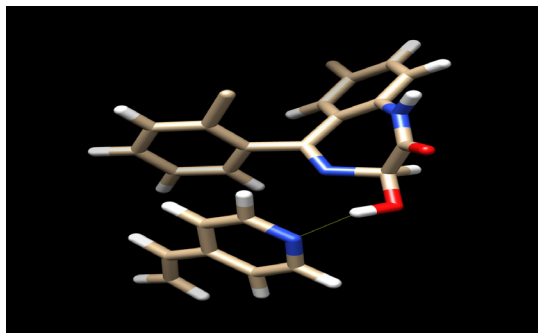


Figura 7: Estudio de enlaces de Hidrógeno entre Lorazepam (template) y 4-Vinilpiridina (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

En el caso de querer determinar el ratio monómero-plantilla, se colocará la molécula plantilla de interés en una caja virtual, de unas dimensiones determinadas, que, posteriormente, se rellena con moléculas de monómero. El siguiente paso consiste en realizar 4 minimizaciones, seguidas de 2 procesos donde se pretende realizar un promedio de las posibles disposiciones que pueden adoptar las moléculas y que simulan el proceso de polimerización. Mediante movimientos de rotación y desplazamiento se consigue que todo el conjunto de moléculas se encuentre en un estado de mínima energía.

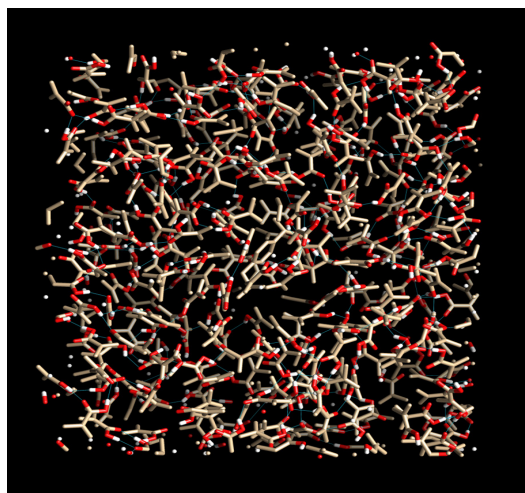


Figura 8: Caja virtual con una molécula de Ibuprofeno (template) y un exceso de Ácido Metacrílico (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

Con este proceso se termina la fase de cálculo. Tras ésta última etapa, si las moléculas seleccionadas son adecuadas, se obtendrá un sistema donde existirán moléculas del monómero funcional, dentro de la caja virtual, que se encuentren formando enlaces de hidrógeno con la molécula plantilla. Estos enlaces pueden ser detectados y estudiados, ya que, con ayuda del programa AutoDock Tools, es posible el cálculo de las energía de enlace entre una molécula plantilla y un monómero. Los distintos modelos estudiados ofrecerán diferentes energías de unión dependiendo de la conformación que adopten las moléculas, pero siempre se elegirá la de menor energía.

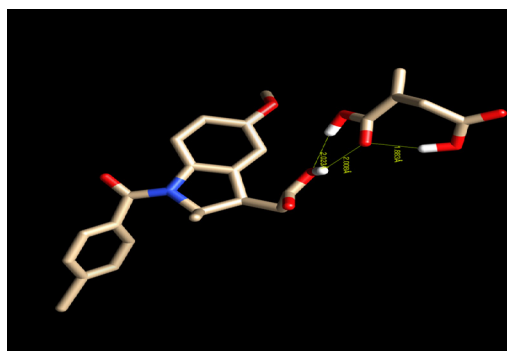


Figura 9: Estudio del ratio entre Indometacina (template) y Ácido Itacónico (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

La selección del polímero más adecuado ha de hacerse teniendo en cuenta factores como: el ratio monómero-template, las afinidades de enlaces o la afinidad por el disolvente o porogen.

3.3. Obtención de espectros de RMN – ¹H

La obtención de los espectros de RMN – ¹H se llevó a cabo a través de un Espectrómetro RMN Bruker Avance 400 MHz con una sonda bbfo.

Preparación de la muestra:

- Se utilizaron diferentes disolventes dependiendo del compuesto del que se fuera a obtener el espectro: CDCl_3 , D_2O , CD_3OD y CD_3CN .
- La cantidad de disolvente adecuada para preparar la muestra que se va a inyectar es de 600 μL .
- La concentración requerida del compuesto del que se va a realizar el espectro es de 2000 ppm aproximadamente. No se requiere exactitud ya que no se realizarán medidas cuantitativas.

Lo primero que se realizó fue un espectro de cada una de las moléculas plantilla y de los monómeros que podían ser utilizados para la síntesis, se utilizaron las cantidades de compuestos y disolventes que se presentan en las siguientes tablas:

Tabla III Cantidades usadas en la preparación de las muestras para la obtención de los espectros de RMN de las moléculas plantilla.

| Moléculas plantilla | Peso (gramos) | Disolvente | Volumen (mL) |
|---------------------|---------------|------------------------|--------------|
| Ibuprofeno | 0,0161 | CDCl_3 | 0,6 |
| Diclofenaco | 0,0159 | D_2O | 0,6 |
| Indometacina | 0,0153 | CDCl_3 | 0,6 |
| Lorazepam | 0,0150 | CD_3OD | 0,6 |
| Diazepam | 0,0153 | CDCl_3 | 0,6 |

Tabla IV Cantidades usadas en la preparación de las muestras para la obtención de los espectros de RMN de los monómeros.

| Monómeros | Peso (gramos) | Disolvente | Volumen (mL) |
|-------------------|---------------|------------------------|--------------|
| 4-Vinilpiridina | 0,0263 | CDCl_3 | 0,6 |
| Ácido itacónico | 0,0180 | CD_3CN | 0,6 |
| Ácido metacrílico | 0,0144 | CDCl_3 | 0,6 |
| Acrilamida | 0,0131 | CDCl_3 | 0,6 |

Para poder observar la estequiometría de las mezclas se seguirá el siguiente procedimiento de trabajo:

- Se calcula la concentración en fracción molar de cada molécula plantilla y monómero.
- Manteniendo el sumatorio de la fracción molar se varía la proporción de cada uno de los dos compuestos, así se comienza con una fracción molar 0,9 para el template y 0,1 para el monómero y se termina con una fracción molar 0,1 para el template y 0,9 para el monómero.
- Por tanto, para cada mezcla molécula plantilla-monómero que se lleve a cabo tendremos 9 espectros, sin contar los 2 correspondientes al 100% de cada una de los compuestos.
- Las mezclas utilizadas son elegidas según los resultados del cálculo computacional.

Todos los espectros han sido procesados a través del programa MestReNova 11.0.

3.4. Síntesis del polímero impreso

Para la síntesis del polímero impreso y con el fin de obtener partículas esféricas de aproximadamente el tamaño de $1\mu\text{m}$ es necesario un exceso de disolvente, que dará lugar a éstas partículas en el seno de una disolución. Con este fin se utilizan los siguientes reactivos:

-Molécula plantilla: Paracetamol

-Monómero: Ácido metacrílico

-Entrecruzador: EGDMA

-Iniciador: AIBN

-Disolvente: Acetona/ACN (3:1)

La síntesis se realiza en un frasco de 120 mL y el método que seguimos se describe a continuación:

-Se añade el disolvente en el recipiente donde se realiza la síntesis.

-Se pesa la cantidad de molécula plantilla adecuada y se añade al disolvente.

-Sonicación 5 minutos.

-Se añade la cantidad de monómero adecuada a la mezcla.

-Sonicación 5 minutos.

-Se añade la cantidad de entrecruzador adecuada a la mezcla.

-Sonicación 5 minutos.

-Se añade la cantidad necesaria de iniciador y rápidamente se agita la mezcla en un agitador durante un minuto aproximadamente.

-Se trata con una corriente de Nitrógeno durante 10 minutos.

-Se coloca en un baño termostatzado durante 24 horas a 60°C

Además del MIP se realiza la síntesis del NIP (polímero no impreso de huella molecular), en la cual se suprime el paso de adición de la molécula plantilla a la mezcla, y se mantiene idéntico el resto del procedimiento.

La síntesis del MIP y NIP se lleva a cabo mediante el método descrito anteriormente. Para ello se pesan y se miden las siguientes cantidades de cada reactivo que se calculan gracias a la relación 1:4:20 de molécula plantilla, monómero y entrecruzador, respectivamente:

Tabla V Cantidades usadas para la polimerización.

| Reactivo | MIP | NIP |
|-------------------|----------------|---------|
| Paracetamol | 0,15107 gramos | - |
| Acetona:ACN (3:1) | 60 mL | 60 mL |
| Ácido metacrílico | 0,34 mL | 0,34 mL |
| EGDMA | 4 mL | 4 mL |
| AIBN | 0,0821 | 0,0821 |



Figura 10: MIP sintetizado con Paracetamol y Ácido metacrílico.

3.5. Obtención de espectros de RMN HR-MAS

La obtención de los espectros de RMN HR-MAS se lleva a cabo a través de un Espectrómetro RMN Bruker Avance 400 MHz con una sonda HR-MAS de 4mm. En este tipo de sonda no se dispone de un dispositivo que trabaje mecánicamente introduciendo los tubos de las muestras de RMN en el espectrómetro a medida que se obtienen los espectros, sino que se trabaja manualmente introduciendo lo que se denominan rotores. Estos recipientes se rellenan con la muestra de la que se pretende obtener el espectro y, en ocasiones, se usan insertos desechables donde se coloca la muestra y que, posteriormente, se colocan dentro del rotor. Utilizando estos insertos se usará un mismo rotor para varios análisis sin necesidad de lavarlo.

El procedimiento llevado a cabo para todas las muestras del polímero es el mismo:

- Se añade, en un eppendorf, 200 mg de la muestra a estudiar. Se añaden 500 μ L del disolvente D_2O y se deja reposar durante una hora.
- Tras los 60 minutos, se agita el eppendorf automáticamente durante unos segundos y se coloca la suspensión dentro del inserto, compactándola todo lo posible.

- Se coloca el inserto en el rotor y se cierra. Se marca con un rotulador la mitad del contorno de la parte inferior del rotor. Esto se hace porque el equipo dispone de un sensor óptico y de esta forma se mide la velocidad de giro.

- La velocidad de giro utilizada para todas las muestras es de 6000 Hz y se realizarán 32 barridos para obtener cada espectro.

Todos los espectros han sido procesados a través del programa MestReNova 11.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cálculo pre – polimerización

Lo primero que se debe determinar a la hora de aplicar los cálculos computacionales es el ratio template-monomero. Para ello se realiza el estudio de los enlaces por puentes de hidrógeno posibles entre las moléculas. Se habla específicamente de este tipo de enlaces a causa de los resultados obtenidos en la modelización molecular. Observando los grupos funcionales susceptibles de formar este tipo de enlaces que presentan nuestras moléculas plantilla, se proponen las siguientes mezclas: Diclofenaco con Ácido itacónico y 4-Vinilpiridina; Ibuprofeno con Ácido itacónico y Ácido metacrílico; Indometacina con Ácido itacónico y 4-Vinilpiridina; Paracetamol con Ácido metacrílico; Lorazepam con 4-Vinilpiridina, Ácido itacónico y Acrilamida y Diazepam con 4-Vinilpiridina.

Utilizando estas mezclas y siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.2., donde se explicó el procedimiento a seguir en el cálculo computacional, se obtienen los siguientes resultados:

Tabla VI Resultados del número de enlaces de hidrógeno que presentan los complejos según el cálculo computacional.

| Molécula plantilla | Monómero | Nº de enlaces de hidrógeno |
|--------------------|-------------------|----------------------------|
| DICLOFENACO | Ácido itacónico | 0 |
| | 4-Vinilpiridina | 0 |
| IBUPROFENO | Ácido itacónico | 1 |
| | Ácido metacrílico | 1 |

| | | |
|--------------|-------------------|---|
| INDOMETACINA | Ácido itacónico | 1 |
| | 4-Vinilpiridina | 0 |
| PARACETAMOL | Ácido metacrílico | 1 |
| LORAZEPAM | 4-Vinilpiridina | 1 |
| | Ácido itacónico | 2 |
| | Acilamida | 3 |
| DIAZEPAM | 4-Vinilpiridina | 0 |

Una vez que se observan los datos obtenidos se descartan las mezclas que nos dan 0 enlaces de hidrógeno. Para el resto de mezclas se calcula la energía de enlace:

Tabla VII Resultados de las energías de enlace de cada complejo según el cálculo computacional.

| Molécula plantilla | Monómero | Energía de enlace (kJ mol ⁻¹) |
|--------------------|-------------------|---|
| IBUPROFENO | Ácido itacónico | -151,27 |
| | Ácido metacrílico | -100,99 |

| | | |
|--------------|-------------------|---------|
| INDOMETACINA | Ácido itacónico | -50,53 |
| PARACETAMOL | Ácido metacrílico | -90,96 |
| LORAZEPAM | 4-Vinilpiridina | -89,33 |
| | Ácido itacónico | -187,10 |
| | Acrilamida | -131,75 |

Para realizar los espectros de RMN – ^1H se hace una selección basándose en la energía de enlace y el ratio que presentan los complejos molécula plantilla – monómero.

A la vista de los resultados se selecciona el complejo Ibuprofeno – Ácido itacónico, ya que presenta menor energía de afinidad que con el Ácido metacrílico. En el caso del Lorazepam, se elimina por menor afinidad la 4-Vinilpiridina y entre los dos complejos restantes se decide aplicar el criterio del ratio y seleccionar la Acrilamida.

A continuación se presentan las imágenes que se obtienen llevando a cabo las simulaciones necesarias para el procedimiento del cálculo computacional y que se corresponden con los resultados que se han descrito en este apartado

- Ibuprofeno – Ácido itacónico

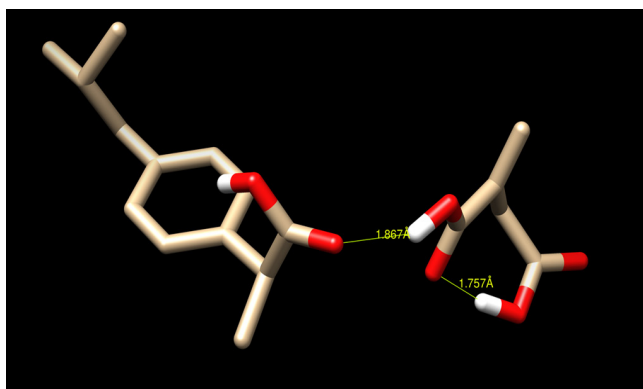


Figura 11: Estudio del ratio entre Ibuprofeno (template) y Ácido Itacónico (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

- Ibuprofeno – Ácido metacrílico

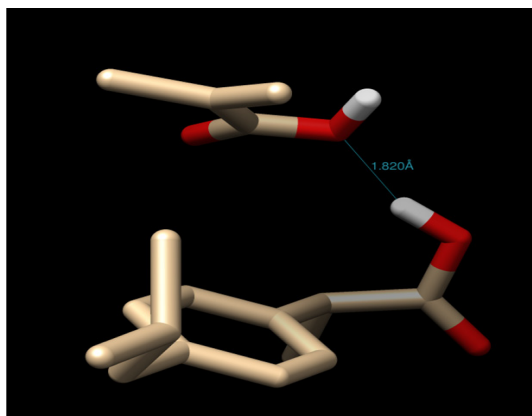


Figura 12: Estudio del ratio entre Ibuprofeno (template) y Ácido Metacrílico (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

- Indometacina – Ácido itacónico

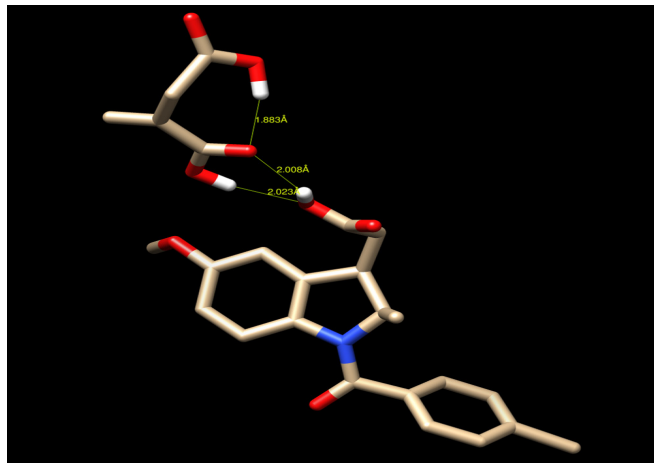


Figura 13: Estudio del ratio entre Indometacina (template) y Ácido Itacónico (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

- Paracetamol – Ácido metacrílico

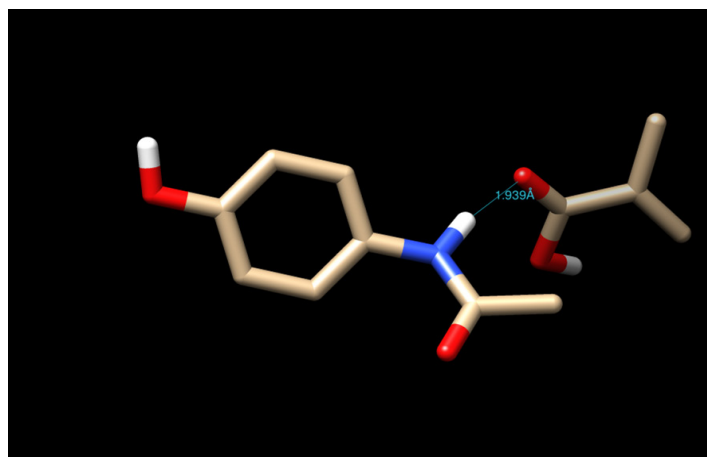


Figura 14: Estudio del ratio entre Paracetamol (template) y Ácido Metacrílico (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

- Lorazepam – 4-Vinilpiridina

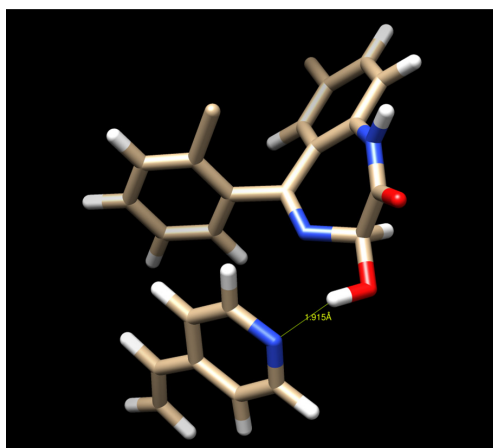


Figura 15: Estudio del ratio entre Lorazepam (template) y 4-Vinilpiridina (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

- Lorazepam – Ácido itacónico

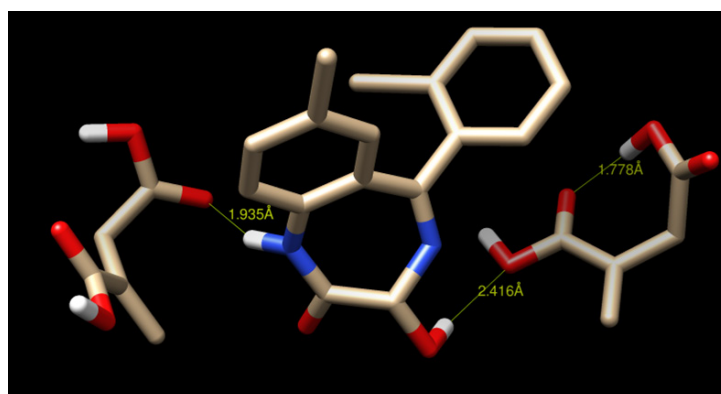


Figura 16: Estudio del ratio entre Lorazepam (template) y Ácido Itacónico (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

- Lorazepam – Acrilamida

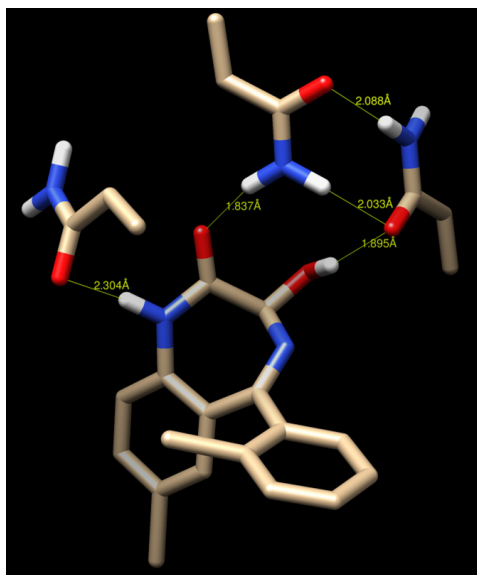


Figura 17: Estudio del ratio entre Lorazepam (template) y Acrilamida (monómero). Fuente: UCSF Chimera 1.10.2.

Se puede observar cómo la síntesis del polímero se consigue gracias a la formación de enlaces o puentes de hidrógeno entre la molécula del medicamento elegido y una, o varias, moléculas del monómero funcional que se enlaza adecuadamente a este. Cuanto menor es la energía de enlace de un determinado complejo template - monómero, los enlaces serán más fuertes y estables. También influirá, en la elección de un determinado monómero funcional para una molécula plantilla, el número de enlaces de hidrógeno que se establezcan entre ellos. Cuanto mayor es el número de enlaces de hidrógeno, se tiene una unión más sólida entre ellos y, lo más importante, más específica. La finalidad de este tipo de polímeros es su actuación como receptor de determinadas moléculas y, una mayor especificidad se la relaciona con un mejor comportamiento receptor. Por ello, los monómeros funcionales que presentan mayores puntos de unión con la molécula plantilla, son mejores candidatos para la preparación del polímero.

4.2. Obtención de espectros de RMN – ^1H para la validación del cálculo computacional

En este apartado se lleva a cabo la presentación y el análisis de los espectros de tres complejos molécula plantilla – monómero: : Indometacina – Ácido itacónico, Ibuprofeno – Ácido itacónico y Lorazepam – Acrilamida.

En el caso del Ibuprofeno con el Ácido itacónico se obtiene un ratio 1:1 según el cálculo computacional. Si se estudia el enlace que nos propone la imagen obtenida mediante la modelización computacional, se observa que éste se forma entre el -OH del grupo ácido del monómero y el oxígeno del grupo ácido de la plantilla. Por tanto si se quieren estudiar los posibles desplazamientos en los espectros se debe recurrir primero al espectro patrón del monómero de Ácido itacónico e identificar cual es la señal que le corresponde al hidrógeno que participa en este enlace.

Una vez analizado el espectro patrón del monómero se identifican las siguientes señales (ver figura 18):

RMN ^1H : δ 3,31 ppm (2H, d) señal D, 5,79 (1H, q) señal C, 6,28 (1H, d) señal B, 9,21 (2H, s) señal A.

Donde las señales se relacionan con los hidrógenos marcados en la molécula.

Se identifica la señal A, como la del hidrógeno que participa en nuestro enlace (ver figura 18). Es una señal de muy baja intensidad y muy ancha y será difícil determinar su desplazamiento en las mezclas molécula plantilla – monómero que se han realizado y se presentan posteriormente (ver figura 19) y de las que se obtienen las siguientes señales:

RMN ^1H : δ 0,91 ppm (1H, d) señal I, 1,44 (6H, d) señal H, 1,86 (2H, m) señal G, 2,49 (4H, d) señal F, 3,37 (1H, dd) señal E, 3,72 (2H, q) señal D, 5,79 (1H, q) señal C, 6,28 (1H, m) señal B, 7,19 (8H m) señal A.

La señal del -OH ,que se ve en el espectro de la figura 19, no es de la suficiente intensidad como para poder integrar el pico automáticamente con el programa, ni de forma manual.

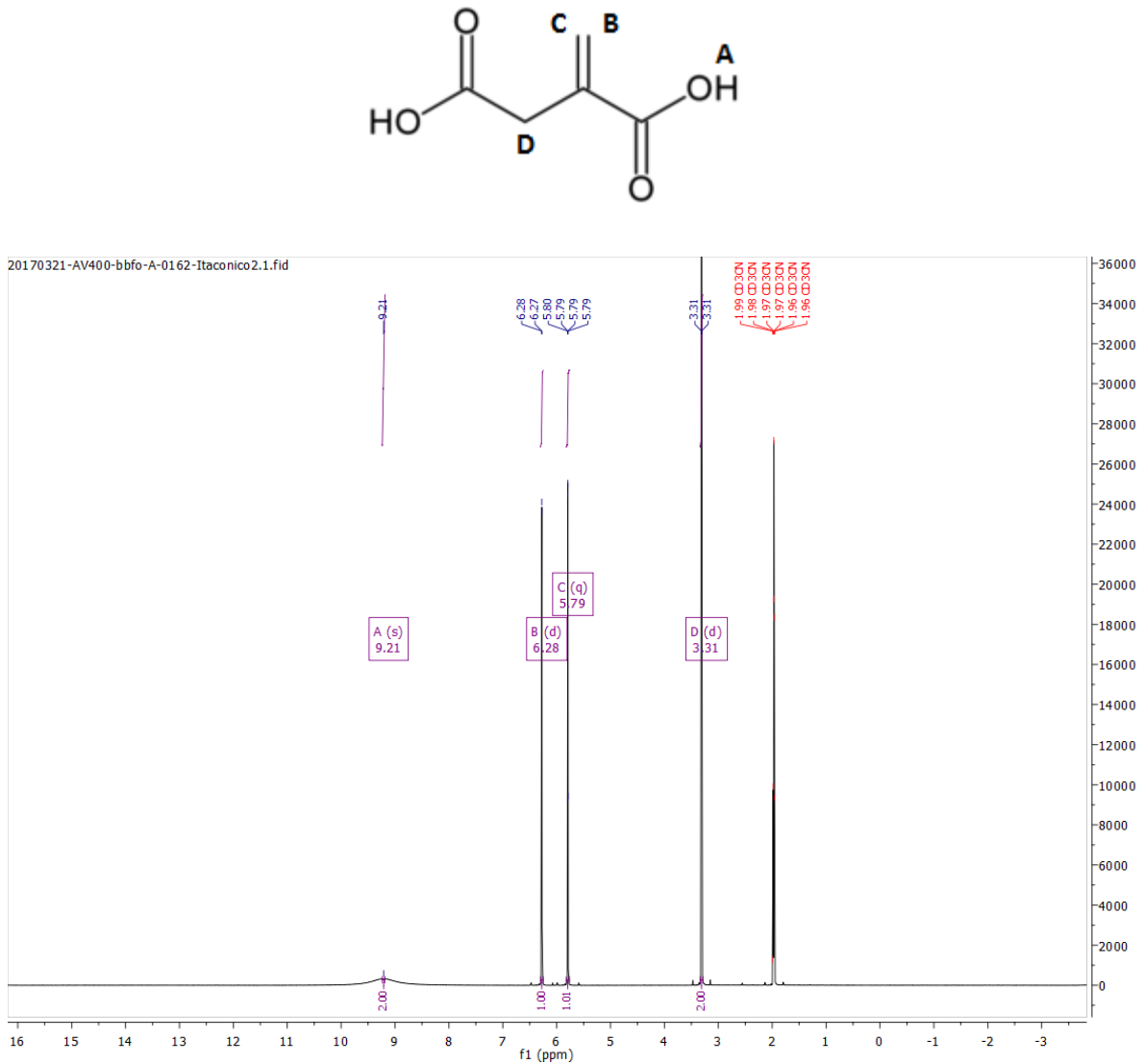


Figura 18 Molécula y espectro de RMN - 1H de Ácido Itacónico en Acetonitrilo deuterado.

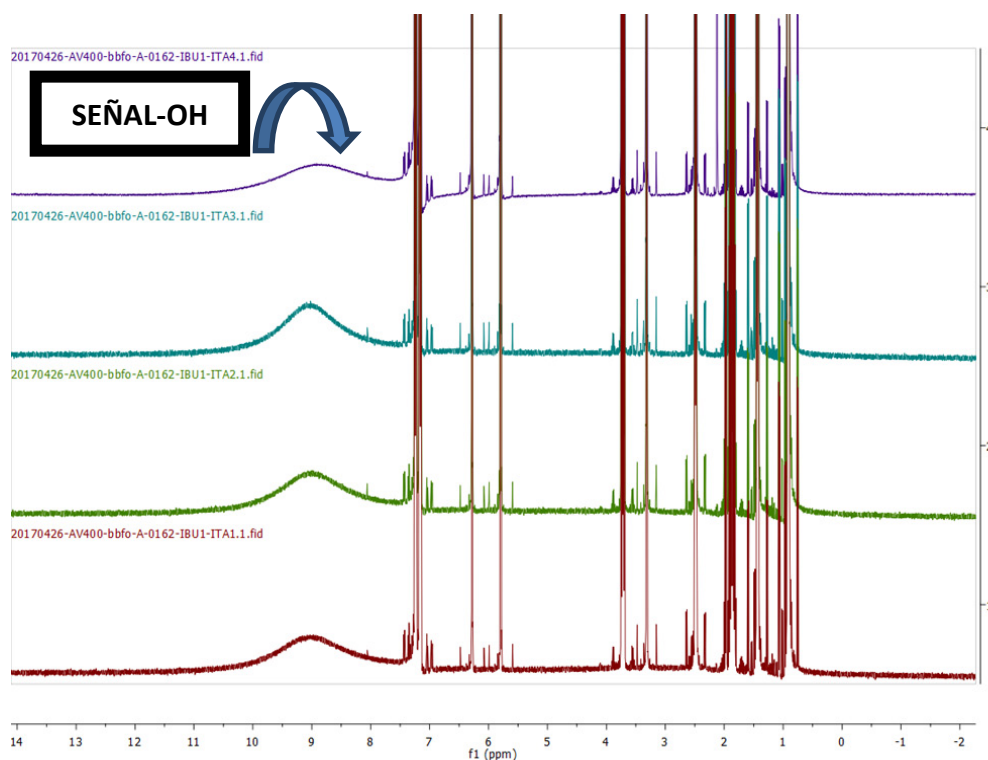


Figura 19: Espectros de RMN - ¹H de las mezclas 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 del Ibuprofeno : Ácido Itacónico (de abajo a arriba según se nombró).

En los espectros correspondientes a las mezclas (ver figura 19) se puede identificar nuestra señal del -OH del enlace, pero no se puede utilizar para estudiar el desplazamiento ya que se trata de un pico muy ancho y con intensidad muy baja en comparación con el resto de picos. Se puede observar que existe un pequeño desplazamiento con relación a la señal del monómero libre y, entre el pico en la mezcla 1:1 y 1:4 también se consigue ver que no se encuentran en la misma posición, pero los desplazamientos son prácticamente inapreciables y mucho menos cuantificables.

Ahora se analiza la segunda mezcla de ratio 1:1 entre la Indometacina y el Ácido itacónico. En este caso se nos proponen dos enlaces a pesar de tener sólo una molécula de monómero. Un enlace se forma entre el -OH del grupo ácido de la plantilla se enlaza con el oxígeno del grupo ácido del monómero y, por otro lado, el -OH del grupo ácido del monómero a su vez se enlaza con el oxígeno del grupo ácido del

template. En este caso se podría estudiar tanto el desplazamiento en la Indometacina como en el Ácido Itacónico, sin embargo y como se veía ya en el caso anterior, los desplazamientos en los espectros son inapreciables. A continuación se presenta una figura con los espectros de este complejo variando las proporciones molécula plantilla – monómero, 90-10%, 80-20%, 70-30%, 60-40%, 50-50%, 40-60%, 30-70%, 20-80% y 10-90%, en los que se obtienen las siguientes señales:

RMN ^1H : δ 2,28 ppm (6H, s) señal J, 3,31 (2H, m) señal I, 3,71 (3H, s) señal H, 3,82 (6H, s) señal G, 5,79 (1H, q) señal F, 6,27 (1H, d) señal E, 6,71 (2H, dd) señal D, 7,00 (4H, m) señal C, 7,57 (4H, m) señal B, 7,67 (4H, m) señal A.

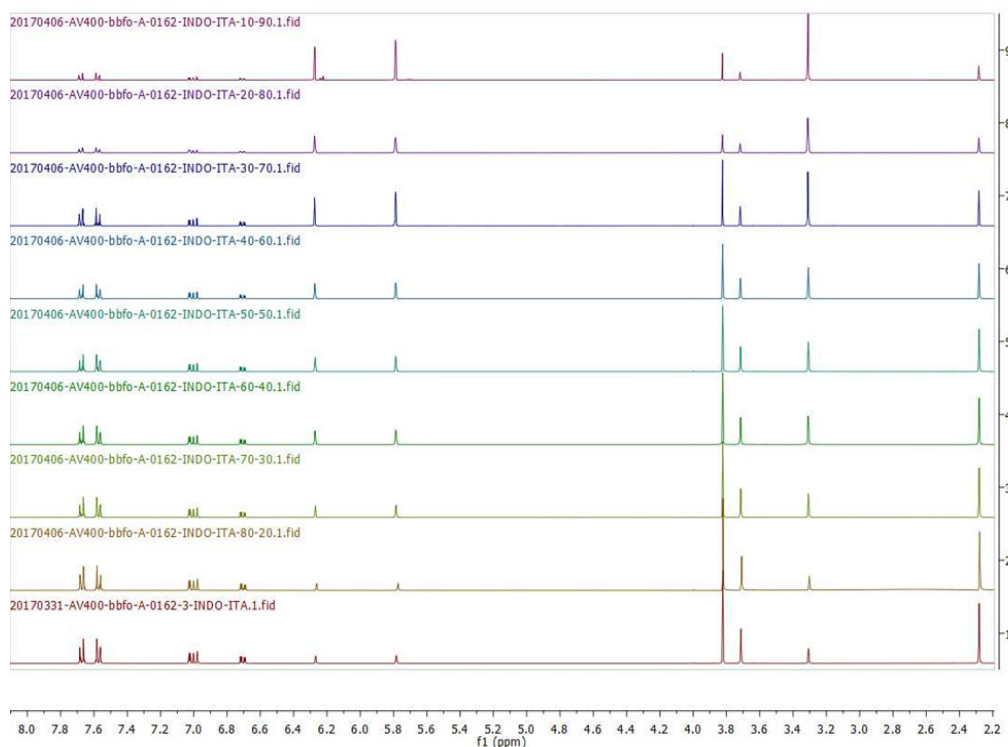


Figura 20: Espectros de RMN-1H con todas las proporciones (desde 90-10 % hasta 10-90% de abajo a arriba) entre Indometacina y Ácido Itacónico en Acetonitrilo deuterado.

Se muestran todas las señales de la mezcla sin observarse ningún cambio significativo. Las intensidades varían según la cantidad de compuesto que lleve la

mezcla pero la posición de los picos no sufre variación, o al menos no puede apreciarse.

Por último se estudia el desplazamiento de las señales en la mezcla 1:3 de Lorazepam y Acrilamida. En este caso tenemos tres enlaces. Dos de ellos a partir de hidrógenos de la molécula plantilla, uno correspondiente al -OH y otro al -NH, enlazados cada uno de ellos a una molécula de monómero por su átomo de oxígeno (ver figura 17). El tercer enlace se presenta a través del -NH₂ de la acrilamida y el oxígeno del Lorazepam. Teniendo esto en cuenta se pueden estudiar los desplazamientos tanto en el Lorazepam como en la Acrilamida, pero siendo posible se prefiere observar el desplazamiento en la molécula plantilla.

Lo primero que se hace es analizar todas las señales de los espectros patrón de la Acrilamida y el Lorazepam (ver figuras 21 y 22), así se podrán identificar los picos que se deben estudiar.

Acrilamida: RMN ¹H: δ 5,75 (1H, dd) señal F, 6,07 (1H, s) señal E, 6,20 (1H, dd) señal C, 6,32 (2H,dd) señal B, 6,51 (1H m) señal A.

Donde las señales las relacionamos con los hidrógenos marcados en la molécula.

Lorazepam: RMN ¹H: δ 5,11 ppm (1H, d) señal F, 7,52 (6H, m) señal C y además vemos 7,035 (1H) , 7,265 (1H).

Donde las señales las relacionamos con los hidrógenos marcados en la molécula de la siguiente manera: señal F – hidrógeno 8, señal a 7,035 ppm – hidrógeno 1, señal a 7,265 ppm - hidrógeno 9 y señal C – hidrógenos 2-7.

En el espectro del Lorazepam se identifica el doblete a 7,265 ppm con la señal correspondiente al hidrógeno del -NH.

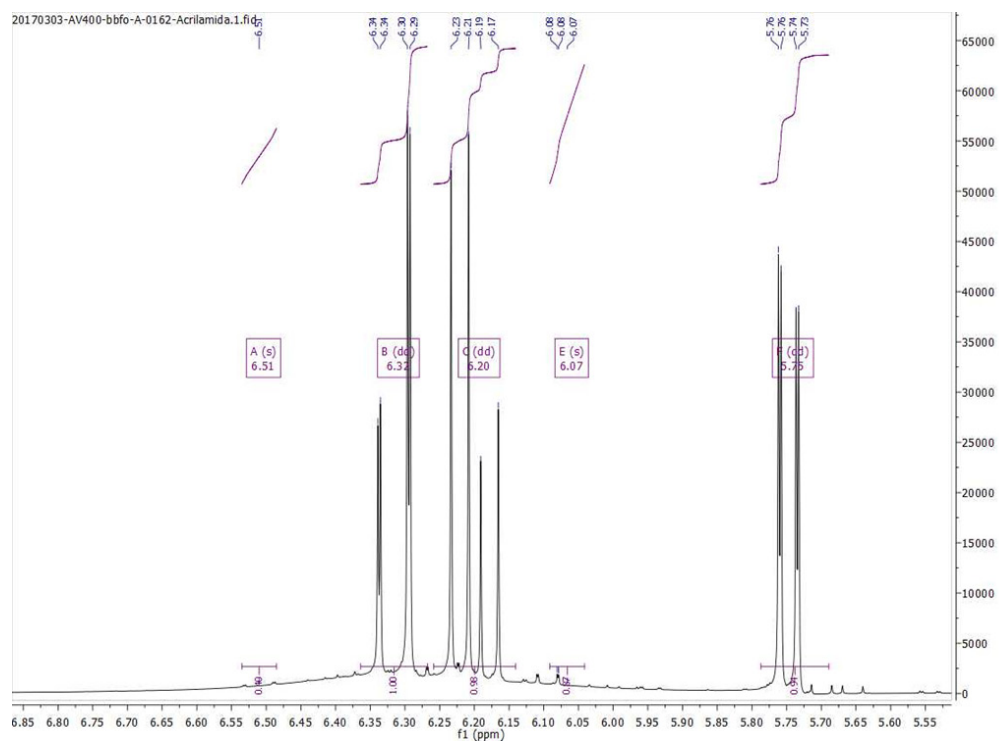
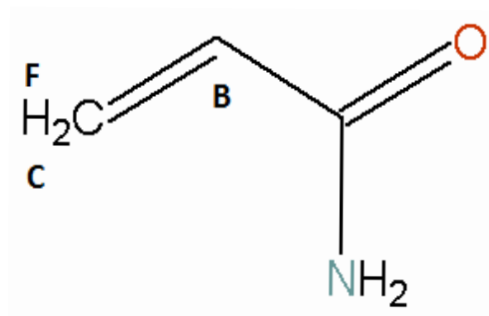


Figura 21 Molécula y espectro de RMN-1H de la Acrilamida en Cloroforno deuterado.

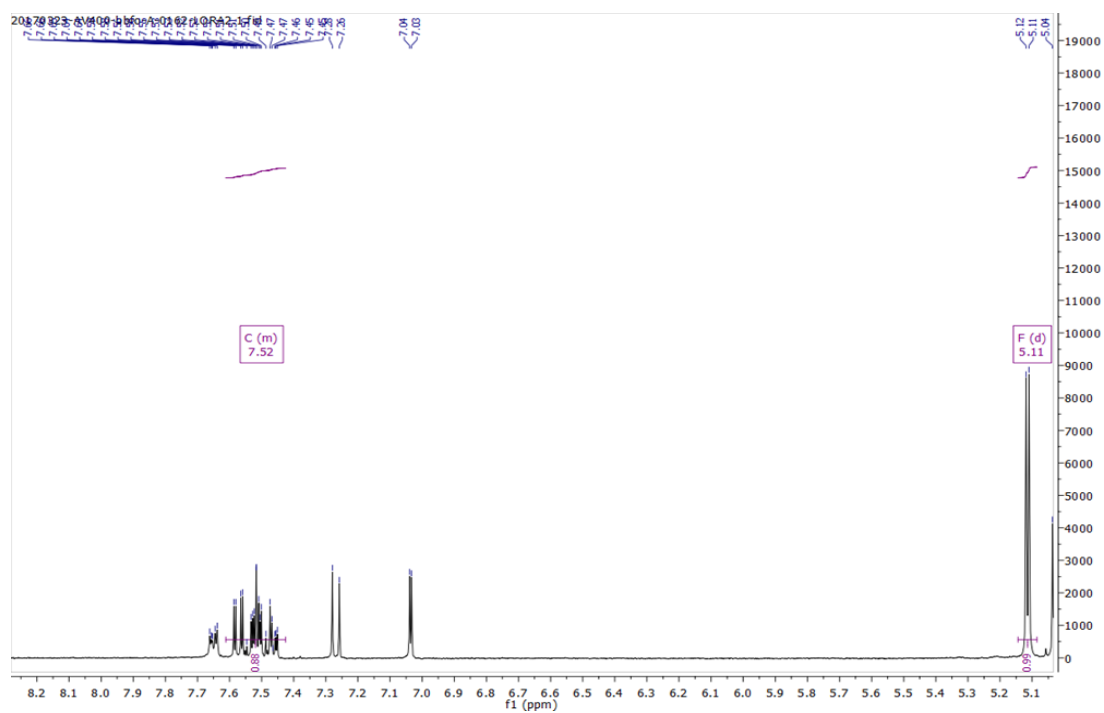
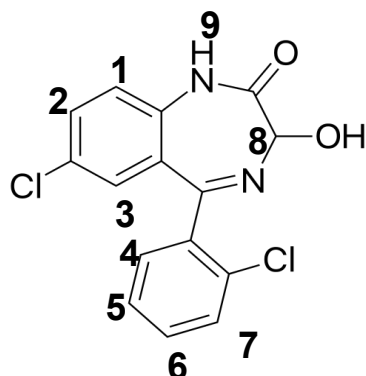


Figura 22: Molécula de Lorazepam y espectro de RMN-1H del Lorazepam en Metanol deuterado.

Un vez se identifican todos los picos se realizan disoluciones con diferentes proporciones plantilla – monómero 90-10%, 80-20%, 70-30%, 60-40%, 50-50%, 40-60%, 30-70%, 20-80% y 10-90%. A partir de los espectros obtenidos de estas disoluciones, se observa que existe cierto desplazamiento de los picos que han sido seleccionados en el espectro patrón de Lorazepam, por ello se hace una ampliación de la zona del espectro para poder estudiar la variación en las posiciones (ver figuras 23, 24 y 25).

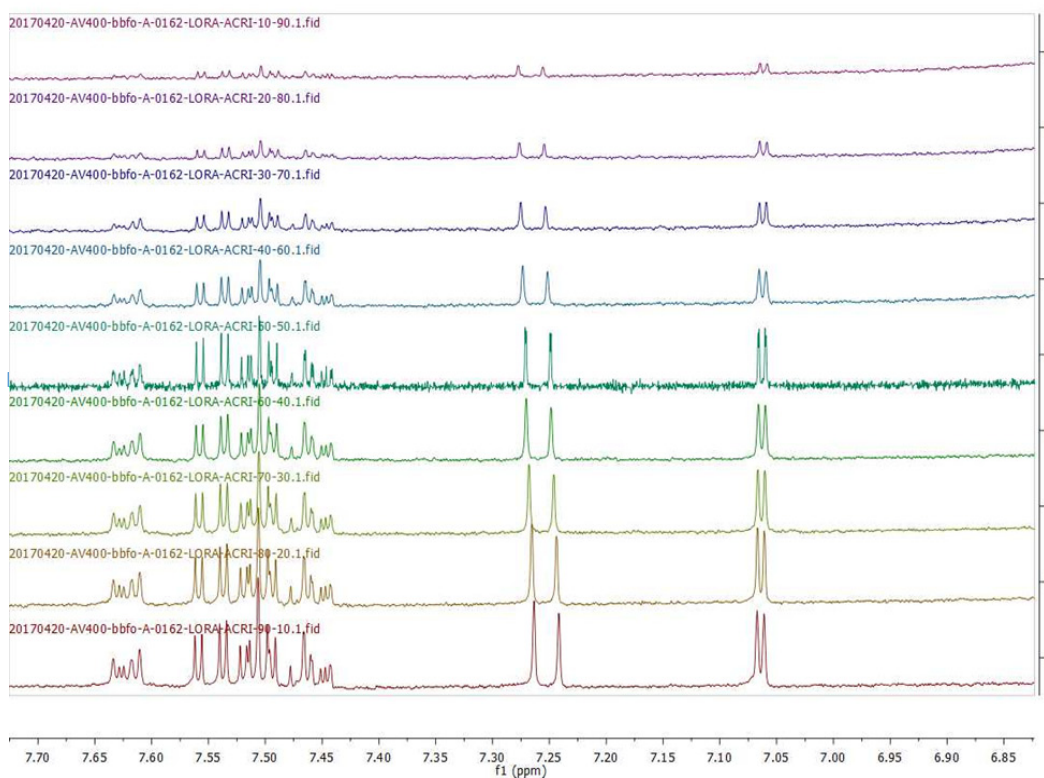


Figura 23: Espectros de RMN-1H de todas las proporciones (desde 90-10 % hasta 10-90% de abajo a arriba) entre el Lorazepam y la Acrilamida en Acetonitrilo deuterado.

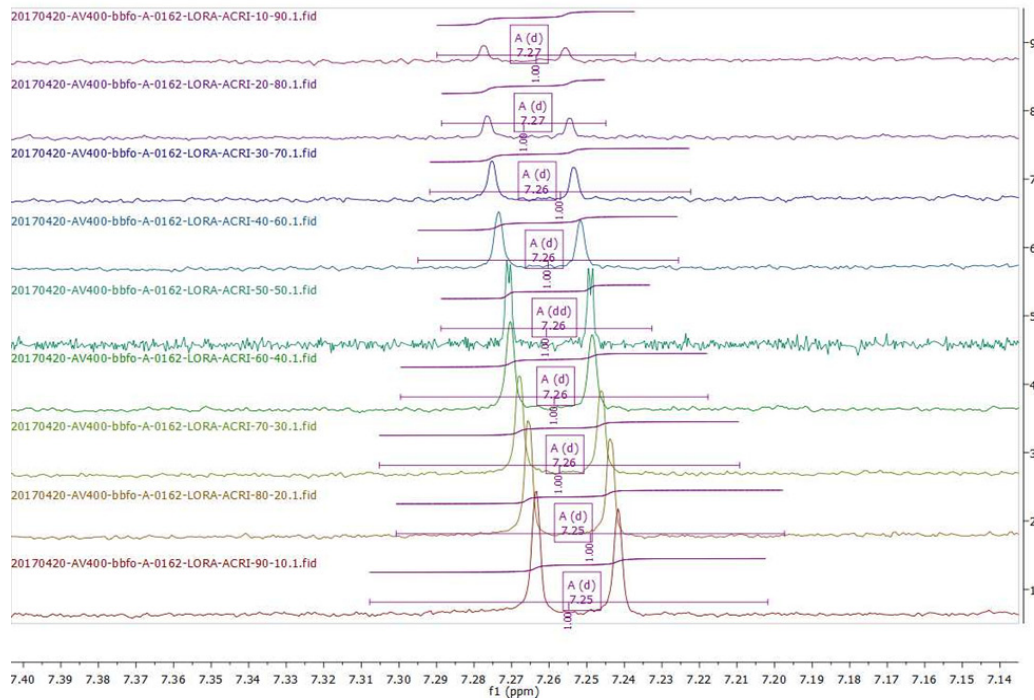


Figura 24 Espectros de RMN-1H con una ampliación de los picos a estudiar de todas las proporciones posibles entre el Lorazepam y la Acrilamida en Acetonitrilo deuterado.

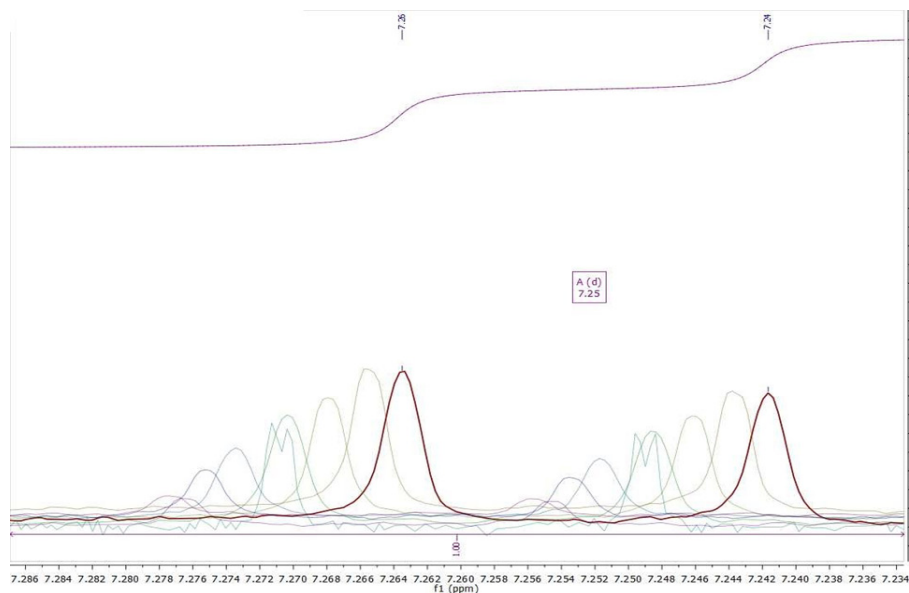


Figura 25: Espectro de RMN-1H con una ampliación de los picos a estudiar de todas las proporciones (desde 90-10 % hasta 10-90% de derecha a izquierda) entre el Lorazepam y la Acrilamida en Acetonitrilo deuterado.

La señal seleccionada para estudiar su desplazamiento es un doblete y se desdoblaría en dos picos. En cada uno de los dos vemos como se desplazan hacia campos más bajos a medida que se va aumentando la proporción de Acrilamida. Si se representa gráficamente el desplazamiento que se obtiene en la señal del doblete se consigue el siguiente gráfico:

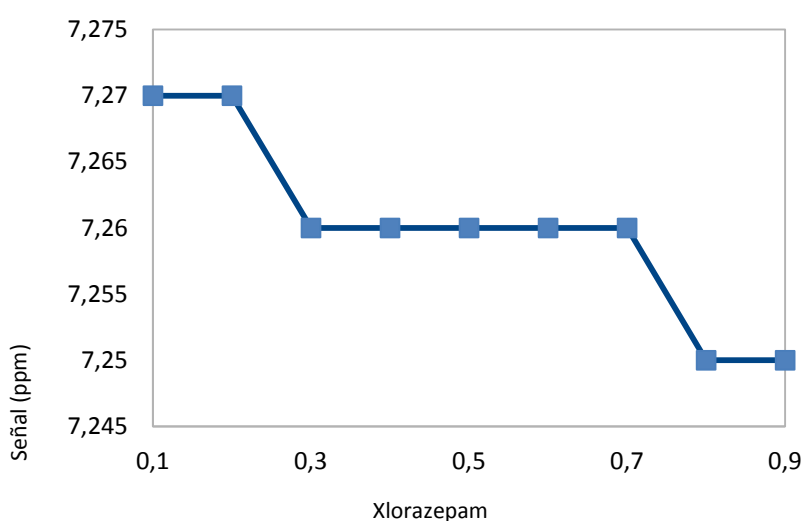


Figura 26: Comportamiento del pico seleccionado: variación de la señal o posición frente de la fracción molar de Lorazepam.

Para analizar más detalladamente la tendencia que sigue la señal seleccionada, se centra la atención solamente en uno de los picos del doblete, se realiza una ampliación del espectro (ver figura 27) y se toman los valores de la señal con mayor número de decimales para hacer un gráfico más detallado (ver figura 28).

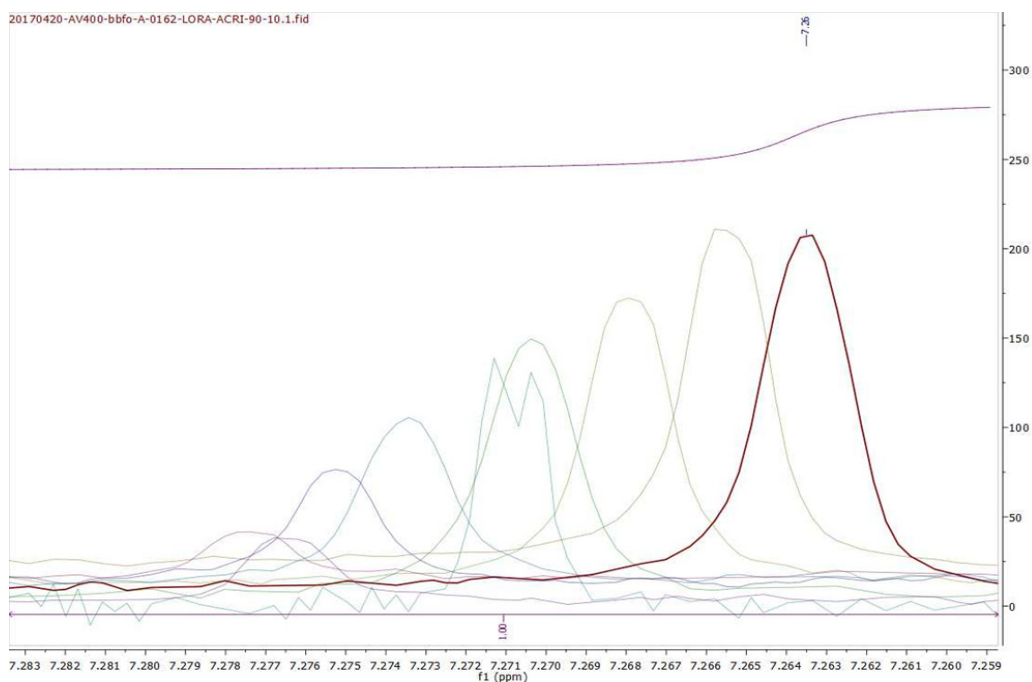


Figura 27 Espectro de RMN-1H con una ampliación de un pico del doblete a estudiar con todas las proporciones (desde 90-10 % hasta 10-90% de derecha a izquierda) entre el Lorazepam y la Acrilamida en Acetonitrilo deuterado.

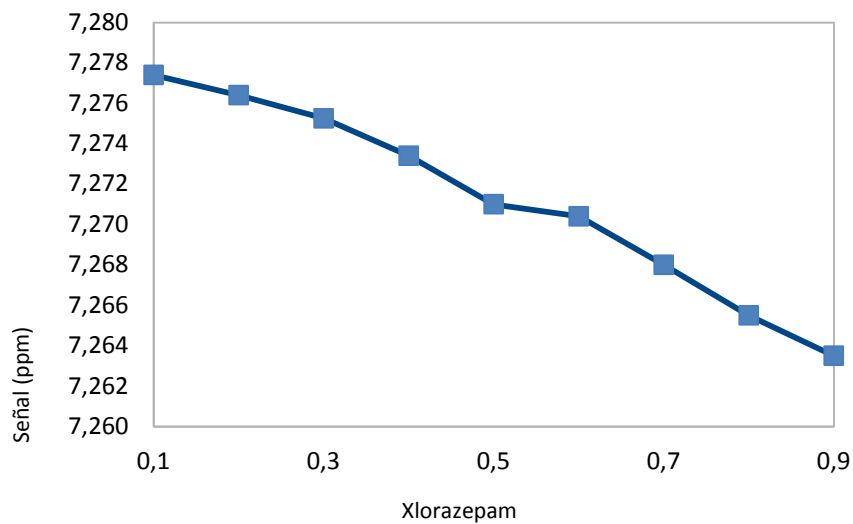


Figura 28 Comportamiento de un pico del doblete seleccionado: variación de la señal o posición frente de la fracción molar de Lorazepam.

A partir de la obtención de los espectros de RMN – ^1H , se demuestra que el uso de la modelización molecular funciona y es útil para el ahorro de material y reactivos, para evitar la generación de residuos con compuestos, muchas veces, tóxicos para el medio ambiente, etc. Como anteriormente se ha expuesto, el cálculo computacional no siempre coincide con los resultados experimentales, debido a que no se tienen en cuenta determinados factores que, en el laboratorio, van a afectar a la síntesis. Por ello, se trabaja con la mezcla que presenta un mayor ratio molécula plantilla - monómero para poder ver mejor los desplazamientos de las señales, además de por ser la mezcla que nos daría un MIP más específico. A medida que se van variando las proporciones entre el compuesto elegido como molécula plantilla (Lorazepam) y el compuesto elegido como monómero (Acrilamida), la señal elegida que se correspondería con uno de los hidrógenos que participan en un puente de hidrógeno que se forma a la hora de sintetizar el polímero, se va desplazando progresivamente hacia campos más bajos del espectro. A pesar de que el cálculo computacional no es una metodología totalmente exacta, se observan resultados bastante parecidos entre los desplazamientos de las señales en los espectros, donde se alcanza el máximo en la proporción 20-80%, y el ratio 1:3 que se propone en el cálculo, que se encontraría entre las proporciones 20-80% y 30-70%.

4.3. Síntesis del polímero impreso

Para la realización de la síntesis del MIP y NIP se sigue el método descrito en el apartado 3.4.. Se decide llevar a cabo la síntesis con el complejo Paracetamol - Ácido metacrílico, debido a que es uno de los sistemas propuestos por el cálculo y se conoce que ofrece unos buenos resultados. Los productos sintetizados presentan un color blanco y, como era de esperar, el aspecto de un polvo de un fino tamaño de partícula. Utilizamos este tipo de polimerización porque es una técnica muy sencilla y que nos proporciona un elevado rendimiento a la hora de polimerizarse.

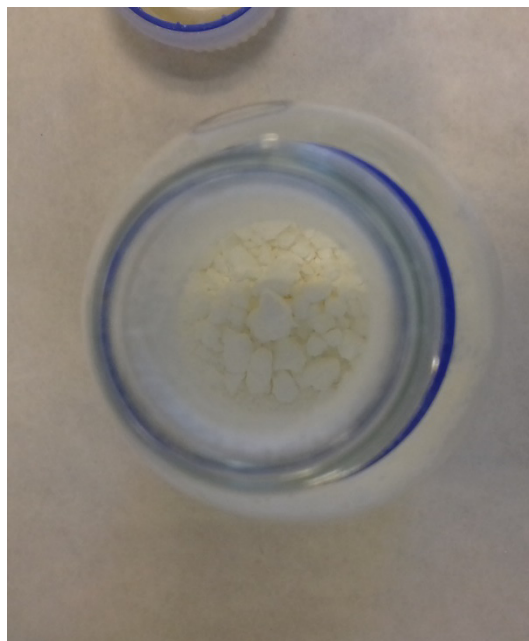


Figura 27 Resultado de la polimerización (MIP).

4.4. Obtención de espectros de RMN HR-MAS

Para la caracterización final de los polímeros impresos y no impresos de huella molecular se emplea la técnica de RMN HR-MAS que nos permite obtener espectros, en nuestro caso de protón, en muestras no líquidas, como es el caso de los MIPs.

Para caracterizar el MIP se debe conocer primero la estructura de la molécula de Paracetamol, identificar los picos y, una vez hecho esto, buscar si existen en el espectro del HR-MAS del MIP.

Por ello lo primero que se presenta es el espectro de HR-MAS del Paracetamol, donde se identifican los siguientes picos que corresponden a las señales asignadas a los hidrógenos en la molécula:

RMN ^1H : δ 7,19 ppm (1H, m) señal A, 6,84 (1H, m) señal B, 2,08 (3H, s) señal C.

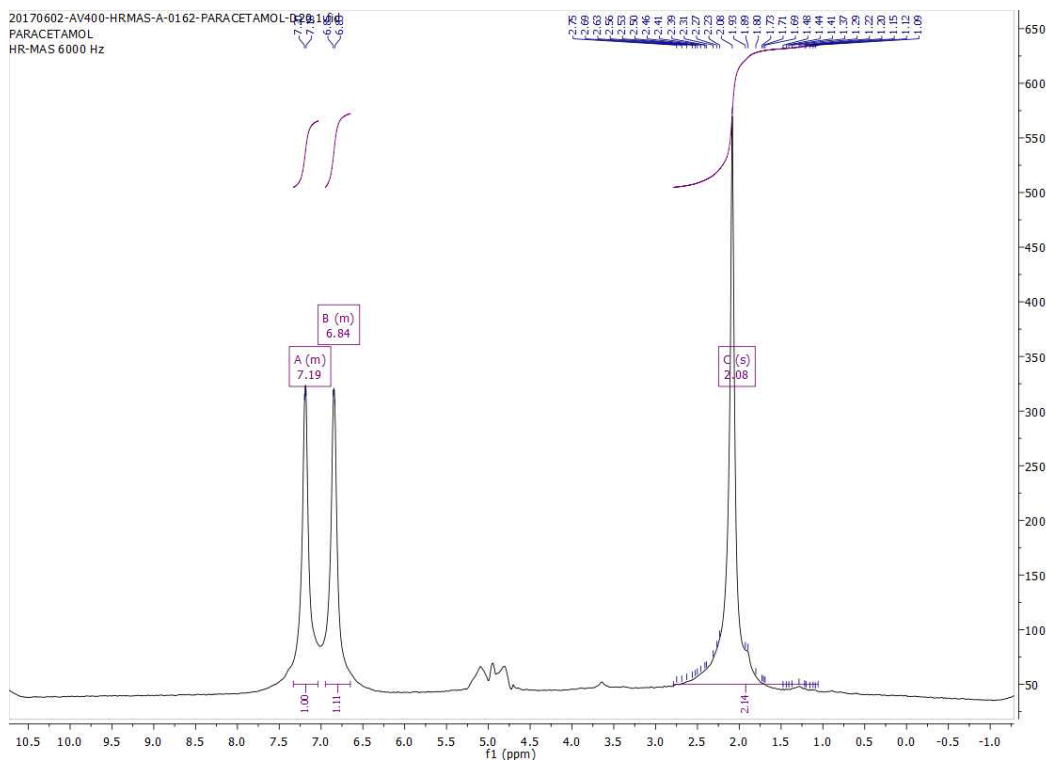
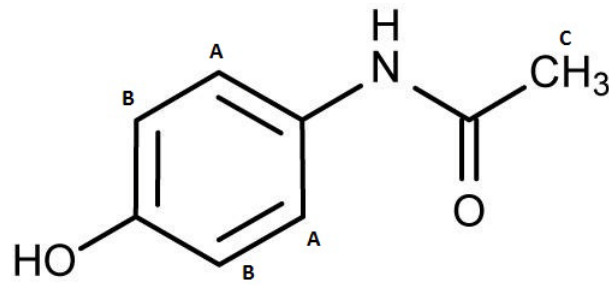


Figura 28 Molécula y espectro en D₂O de Paracetamol por RMN HR-MAS.

Además se identifican las señales correspondientes al EGDMA, ya que la proporción de éste es 1:20, Paracetamol : EGDMA, y podrían verse señales correspondientes a sus átomos de hidrógeno.

RMN ¹H: δ 6,14 ppm (2H, dq) señal A, 5,60 (2H, p) señal B, 4,41 (2H, s) señal C, 1,96 (3H dd), señal D.

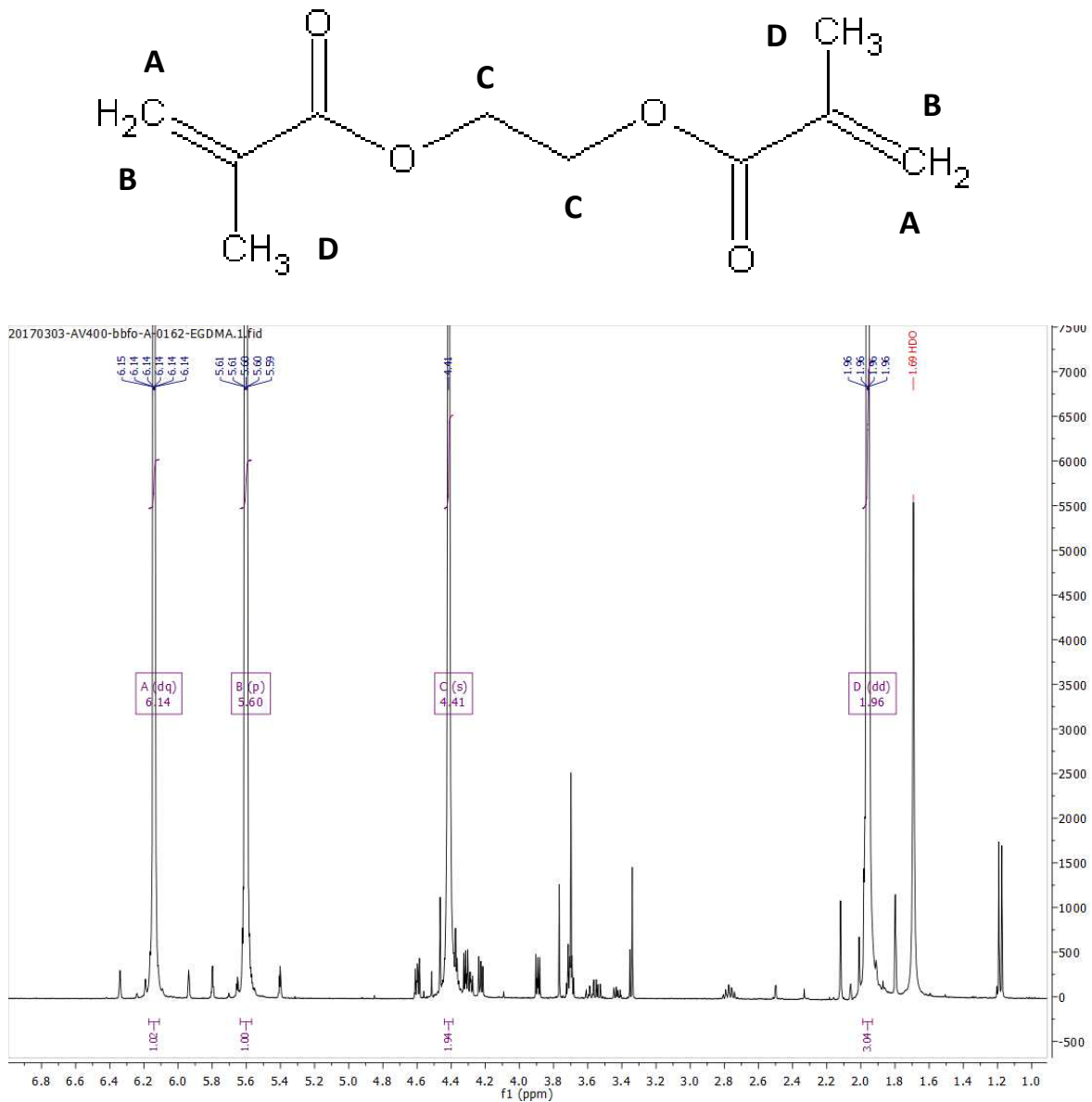


Figura 28 Molécula y espectro de RMN-1H en CDCl₃ de EGDMA.

Una vez se consiguen asignar las señales de ambas moléculas con las que aparecen en los espectros, se realiza la medida y se obtiene el espectro de HR-MAS del MIP sintetizado, y se identifica en él la señal del Paracetamol.

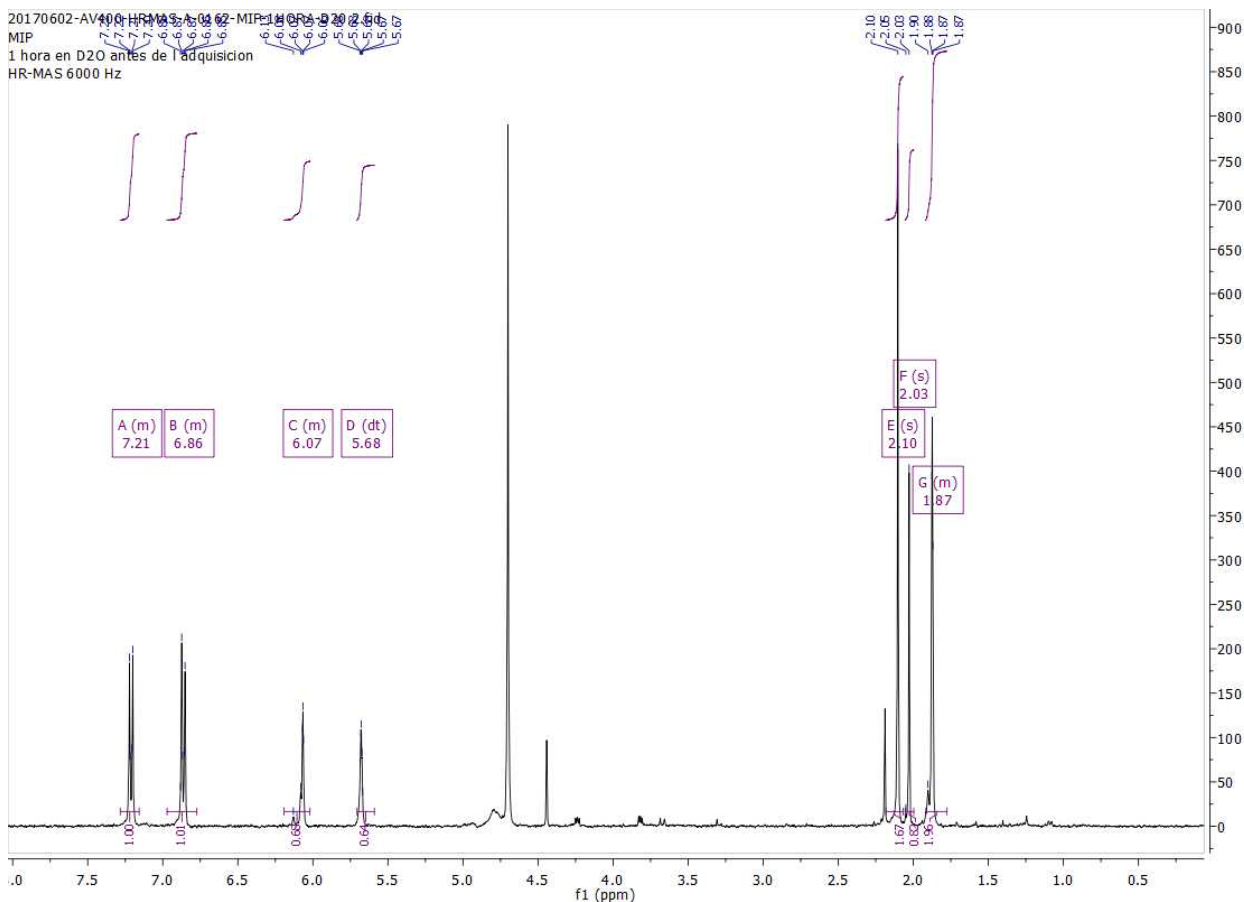


Figura 29 Espectro de MIP en D₂O mediante la técnica de RMN HR-MAS.

Tal y como se puede observar en la figura 29, las señales que aparecen son las siguientes y se asignan de la siguiente manera:

Tabla VIII Asignación de las señales del espectro del MIP.

| Señal en espectro | δ (ppm) | Asignación en molécula | Multiplicidad | Molécula |
|-------------------|----------------|------------------------|---------------|-------------|
| A | 7,21 | A | m | Paracetamol |
| B | 6,86 | B | m | Paracetamol |
| C | 6,07 | A | m | EGDMA |
| D | 5,08 | B | dt | EGDMA |
| E | 2,10 | | s | |
| F | 2,03 | C | s | Paracetamol |
| G | 1,87 | D | m | EGDMA |

Para comprobar que las asignaciones que se han realizado son correctas se lleva a cabo el análisis del espectro del polímero no impreso con Paracetamol (NIP) mediante la misma técnica de HR-MAS y se compara con el espectro anterior.

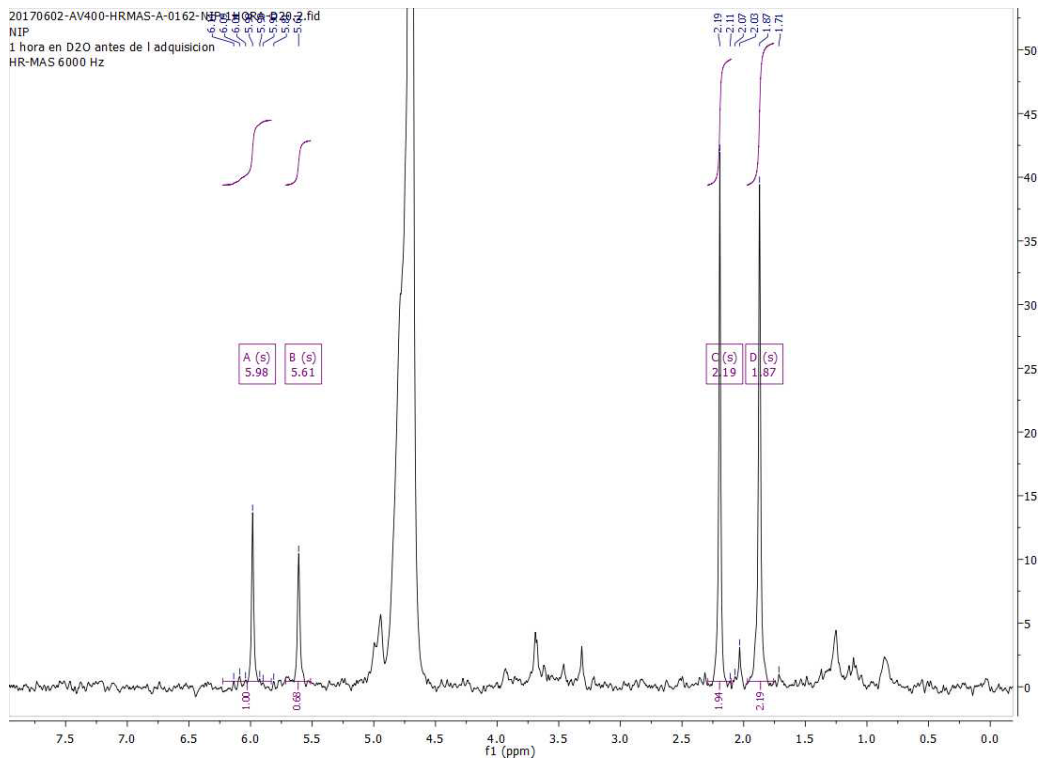


Figura 30 Espectro del NIP en D₂O mediante la técnica de RMN HR-MAS.

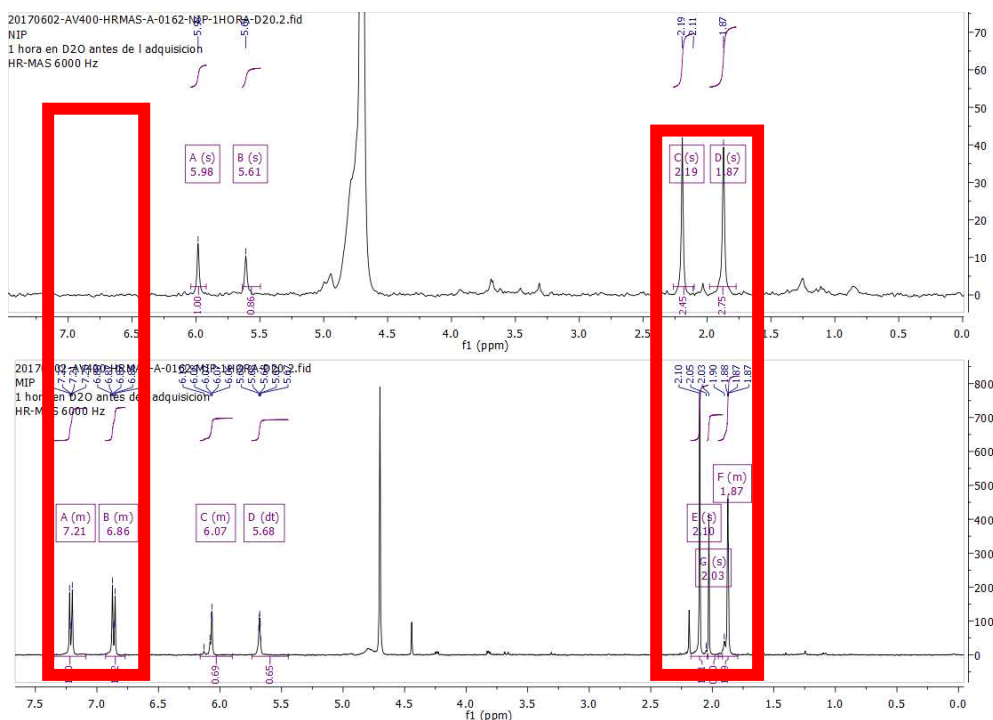


Figura 31 Comparación de espectros MIP y NIP de RMN HR-MAS en D₂O.

A pesar de que el RMN HR-MAS es una técnica que no daría resultados tan buenos como en el caso del RMN convencional, ya que suele ofrecer señales mucho más anchas y menos definidas, se pueden apreciar perfectamente las diferencias entre cada uno de los polímeros que se ha sintetizado y así caracterizarlos. Se comprueba como las asignaciones que se realizaron para las señales del Paracetamol en el espectro del MIP son correctas ya que, en el caso del NIP, no aparecen dichas señales. Esto es debido a que en su síntesis no se utiliza este compuesto. También se podría concluir que, efectivamente, las señales que se habían asignado al EGDMA en el espectro del MIP se corresponden con las de dicho compuesto. En el caso del espectro del NIP también aparecen y esto ocurre porque para la polimerización siempre es necesario el uso del entrecruzador, en este caso el EGDMA. Con esto se demuestra que la técnica del RMN HR-MAS es útil y funciona para la caracterización de nuestros polímeros.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se consiguen llegar en este trabajo están relacionadas con los objetivos que se pretendían alcanzar inicialmente.

Se ha comprobado que el cálculo computacional es una buena herramienta para la determinación de la composición y estequiometría de los polímeros impresos de huella molecular, ya que los resultados obtenidos mediante esta técnica coinciden con lo conseguido experimentalmente con el RMN-¹H convencional. Facilitan, por tanto, el trabajo que sería necesario realizar en el laboratorio, mediante diferentes ensayos hasta dar con el MIP adecuado. A su vez, se valida esta metodología de pre-polymerización llevando a cabo la síntesis del MIP y NIP.

Se ha demostrado que la espectroscopía de RMN HR-MAS permite distinguir las bandas de interés y observar las diferencias entre el MIP y NIP en sus espectros, con lo cual se valida como técnica para la caracterización de polímeros impresos de huella molecular.

6. CONCLUSIONES

As conclusións ás que somos capaces de chegar neste traballo, están relacionadas cos obxectivos que inicialmente se trataron de alcanzar.

Verificouse que o cálculo computacional é un bo instrumento para determinar a composición e a estequiometría dos polímeros de pegada molecular, e que os resultados obtidos por esta técnica correspóndense co obtido experimentalmente polo RMN-¹H convencional. Polo tanto, fan máis sinxelo o traballo que sería necesario facer no laboratorio, mediante diferentes probas para dar co MIP apropiado. Pola súa banda, esta metodoloxía de pre-polimerización é validada coa realización da síntese de MIP e NIP.

Demóstrase que a espectroscopía de RMN HR-MAS permítenos distinguir as bandas de interese e observar as diferenzas entre o MIP e NIP nos espectros, polo tanto é validada como unha técnica para a caracterización de polímeros de pegada molecular.

7. CONCLUSIONS

The conclusions reached in this work are related to the objectives that were initially intended.

It has been verified that the computational chemistry is a good tool for the determination of the composition and stoichiometry of the molecular imprinted polymers, since the results obtained by this technique agree with what was achieved experimentally with conventional $^1\text{H-NMR}$. They facilitate, therefore, the work that would be necessary to perform in the laboratory, through different tests until finding the appropriate MIP. At the same time, this methodology of prepolymerization is validated by carrying out the synthesis of the MIP and NIP.

HR-MAS NMR spectroscopy allows to distinguish the bands of interest and to observe the differences between MIP and NIP in their spectra, which is validated as a technique for the characterization of molecular imprinted polymers.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Christensen, F.M.: Pharmaceuticals in the environment. A human risk?. Regul Toxicol Pharmacol, 1998, 28, 212-221.
- [2] Crane, M., Was, C., Boucard, T.: Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. Sci Total Environ, 2006, 367, 23-41.
- [3] Pichon, V.; Chapuis-Hugon, F. (2008). "Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants- A review". Analytica Chimica Acta, 622, 1-2, 48-61.
- [4] Mayes; Whitcombe. (2005). "Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers". Advance Drug Delivery Reviews, 57(12), 1742-1778.
- [5] Tsermentseli, S.K.; Manesiotis, P.; Assimopoulou, A. N.; Papageorgiou, V.P. (2013). "Molecularly imprinted polymers for the isolation of bioactive naphthoquinones from plant extracts". Journal of Chromatography A, 1315, 15-20.
- [6] Bompert, M.; Goto, A.; Wattraint, O.; Sarazin, C.; Tsujii, Y.; Gonzatoo, C; Haupt, K. (2015). "Molecularly imprinted polymers by reversible chain transfer catalysed polymerization". Polymer, 78, 31-36.
- [7] Bates, F.; Cela-Pérez, M. C.; Karim, K.; Piletsky, S.; López-Vilariño, J. M. (2016). "Virtual Screening of Receptor Sites for Molecularly Imprinted Polymers". Macromolecular Bioscience.
- [8] Giménez Martínez, J. J.; Expósito López, J. M. (1998). "RMN para químicos orgánicos". Universidad de Almería. Servicio de Publicaciones: Instituto de Estudios Almerienses.
- [9] Skogsberg, U.; Meyer, C.; Rehbein, J.; Fisher, G.; Schauff, S.; Welsch, N.;

Albert, K.; Hall, A.J.; Selligren, B. (2007). "A solid-state and suspended-state magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopic investigation of a 9-ethyladenine molecularly imprinted polymer". *Polymer*, 48, 229-238.

[10] García Aparicio, C. (2012). "Resonancia Magnética Nuclear de sólidos y su aplicación a la caracterización de polímeros". CSIC. ICTP. Servicio de caracterización de Madrid.

[11] Henoumont, C.; Laurent, S.; Muller, R.N.; Vancer Elst, L. (2015). "HR-MAS NMR Spectroscopy: An Innovative Tool for the Characterization of Iron Oxide Nanoparticles Tracers for Molecular Imaging". *Analytical Chemistry*, 87, 1701-1710.

[12] Blasco Lanzuela, T. (2009). "Resonancia magnética nuclear de sólidos". Instituto de Tecnología Química (UPV-CSIC). Valencia. Presentación realizada en Escuela de Jaca, Junio 2009.

[13] Simpson, A.J.; Kingery, W.L.; Shaw, D.R.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Dvortsak, P. (2001). "The Application of ^1H HR-MAS NMR Spectroscopy for the Study of Structures and Associations of Organic Components at the Solid-Aqueous Interface of a Whole Soil". *Environmental science & technology*, 35, 3321-3325.

[14] Farooq, H.; Courtier-Murias, D.; Soong, R.; Bermel, W.; Kingery, W.M.; Simpson, A.J. (2013). "HR-MAS NMR Spectroscopy: A Practical Guide for Natural Samples". *Current Organic Chemistry*, 17, 3013-3031.

[15] Escudero Belmonte, A. (2004). "Resonancia magnética nuclear aplicada al estado sólido". *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. Instituto de Ciencia de los materiales de Sevilla. Abril-Junio, 27-36.