

**DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS IMPRESOS
MOLECULARMENTE (MIPS) PARA LA DETERMINACIÓN DE RODAMINA B:
ENFOQUE TEÓRICO Y EXPERIMENTAL**

YULIANA OSPINA YEPES

Trabajo de investigación para optar al título de Química

DIRECTORES:

Luis Fernando Giraldo Morales

Víctor Hugo Orozco López

Laboratorio de Investigación en Polímeros

-LIPOL-

MEDELLÍN

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE QUÍMICA

2020

AGRADECIMIENTOS

- Al Laboratorio de Investigación en Polímeros (LIPOL) y a la asesoría del Dr. Luis Fernando Giraldo Morales y del Dr. Víctor Hugo Orozco López.
- Al profesor César Augusto Pérez y la estudiante Ana María Muñoz Jaramillo por su desarrollo del enfoque teórico y computacional de este trabajo.
- A Daniel Orozco López por la colaboración en los análisis de recaptación
- A Relaciones Internacionales y al Instituto de química por la colaboración en los trámites requeridos para la pasantía.
- A Jorge Ruíz del Instituto de Química por su colaboración con los análisis de IR
- Al profesor Javier Silva por la colaboración prestada durante el proyecto.
- A la profesora Miriam por su apoyo en los aspectos experimentales y personales.
- A Mauricio, Marcela, Juan, Mario y Camilo por todo su apoyo durante mi pasantía.
- A mi familia, amigos y a todas las personas maravillosas que conocí a lo largo de esta hermosa carrera y apoyaron todos mis proyectos.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABLAS	3
RESUMEN GRÁFICO.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
1 MARCO TEÓRICO	7
1.1 Polímeros de impresión molecular.....	7
1.1.1 Proceso de impresión molecular.....	8
1.1.2 Optimización de la síntesis	9
1.1.2.1 Monómeros funcionales	9
1.1.2.2 Entrecruzantes	10
1.1.2.3 Solventes	11
1.1.2.4 Iniciadores	11
1.1.2.5 Plantilla.....	12
1.1.3 Técnicas de impresión	13
1.1.3.1 Sensado químico y biológico	13
1.1.4 Aspectos críticos.....	15
1.2 Polímeros de impresión molecular como biosensores	16
1.2.1 Biomoléculas y receptores biológicos	16
1.3 Cáncer	16
1.3.1 Generalidades del cáncer	18
1.3.2 Cáncer colorrectal.....	19
1.3.3 Detección	21

1.3.3.1	Pruebas de heces fecales	22
1.3.3.2	Exámenes visuales (estructurales).....	23
1.3.4	Interleucinas.....	23
1.3.4.1	Interleucina 4.....	24
1.3.4.2	IL-4 como biomarcador del cáncer colorrectal	25
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
4	HIPÓTESIS	29
5	OBJETIVOS.....	29
5.1	Objetivo General.....	29
5.2	Objetivos Específicos.....	29
6	METODOLOGÍA.....	30
6.1	Dinámica molecular	30
6.1.1	Definición de variables	30
6.1.2	Modelación de parámetros iniciales	31
6.1.3	Simulación LAMMPS	31
6.1.4	Análisis estructural	31
6.2	Optimización de la síntesis	32
6.3	Síntesis de MIPs y NIPs.....	33
6.4	Purificación	35
6.4.1	Agitación-Centrifugación decantación	36
6.4.2	Filtración al vacío	36
6.4.3	Soxhlet.....	36
6.5	Caracterización	37
6.5.1	Espectroscopía Infraroja (FTIR).....	37

6.5.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	37
6.5.3	Dispersión de luz dinámica (DLS)	37
6.5.4	Análisis termogravimétrico	37
6.6	Recaptación.....	38
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1	Dinámica molecular	39
7.2	Optimización de la síntesis	40
7.3	Síntesis de MIP	42
7.4	Purificación	42
7.5	Caracterización	44
7.5.1	Análisis estructural	44
7.5.2	Morfología.....	46
7.5.3	Tamaño de partícula	47
7.5.4	Análisis termogravimétrico	47
7.6	Recaptación.....	48
8	CONCLUSIONES	51
9	PERSPECTIVAS.....	53
	ANEXO. APORTES DEL PROYECTO.....	54
	REFERENCIAS	56

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Representación esquemática del proceso de impresión molecular (A.G. Mayes M. J., 2005).....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2. Estructuras químicas de los monómeros más utilizados. A: Impresión covalente, B: Impresión no covalente, C: Semi covalente, D: Intercambio de ligando (Lingxin Chen, 2016)</i>	<i>10</i>
<i>Figura 3. Estructuras químicas de los entrecruzantes más utilizados. A: Impresión covalente, B: Impresión no covalente, C: impresión sol-gel, D: Nuevos entrecruzantes (Lingxin Chen, 2016).....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 4. Estructuras químicas de los iniciadores más comunes (Lingxin Chen, 2016)</i>	<i>12</i>
<i>Figura 5. Representación esquemática de la construcción de un sensor basado en MIP (Lingxin Chen, 2016).....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 6. Diagrama de las partes del intestino grueso</i>	<i>20</i>
<i>Figura 7. Esquema de las vías del cáncer en la tumorigénesis. Cancer Stem Cells;2006; Vol. 1.(p.182) (Jordan, Guzman, & Noble, 2006).....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 8. Estructura tridimensional de la Interleukin 4 (2B8U) humana de tipo salvaje (Kraich M, 2006).....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 9. Superficie de potencial de la proteína 2B8U. Secciones azules representan fracciones positivas y secciones rojas fragmentos negativos. A su vez, los segmentos blancos representan los neutros</i>	<i>25</i>
<i>Figura 10. Planteamiento del problema.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 11. Definición de variables para dinámica molecular.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 12. Análisis poblacional después de las simulaciones.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 13. Reactivos empleados para la optimización de la síntesis</i>	<i>33</i>
<i>Figura 14. Modificación de variables para la optimización</i>	<i>33</i>
<i>Figura 15. Reactivos de síntesis.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 16. Reactor de polimerización.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 17. Esquema gráfico del proceso de síntesis</i>	<i>35</i>
<i>Figura 18. Lavados para eliminar la plantilla</i>	<i>35</i>
<i>Figura 19. Filtración al vacío para purificación</i>	<i>36</i>
<i>Figura 20. Sistema soxhlet para purificación</i>	<i>37</i>
<i>Figura 21. Esquema gráfico de la prueba de recaptación</i>	<i>38</i>
<i>Figura 22. Moléculas de monómero y solvente alrededor de la RhB.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 23. Cavity de RhB.....</i>	<i>40</i>

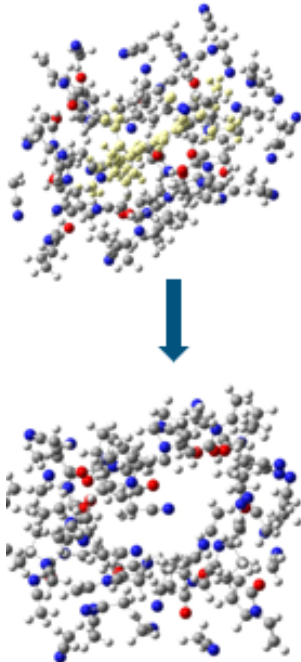
<i>Figura 24. Resultados de la optimización de la síntesis</i>	41
<i>Figura 25. Condiciones óptimas de reacción</i>	41
<i>Figura 26. Síntesis de los cuatro grupos de polímeros</i>	42
<i>Figura 27. Purificación de los polímeros</i>	43
<i>Figura 28. Espectro Infrarrojo de los polímeros sintetizados a partir de MAA</i>	44
<i>Figura 29. Espectro Infrarrojo de los polímeros sintetizados a partir de N-VP</i>	45
<i>Figura 30. Espectro infrarrojo del polímero comparado con los materiales de partida</i>	46
<i>Figura 31. Microesferas de los 4 grupos de polímeros</i>	46
<i>Figura 32. Análisis termogravimétrico (pérdida de peso vs temperatura)</i>	48
<i>Figura 33. Curva de Calibración RhB</i>	48
<i>Figura 34. Resultados de Recaptación</i>	49
<i>Figura 35. Conclusiones gráficas</i>	52
<i>Figura 36. Pasantía de Investigación</i>	54
<i>Figura 37. Simposio de Investigación</i>	54
<i>Figura 38. Póster: pasantía de investigación</i>	55

LISTA DE TABLAS

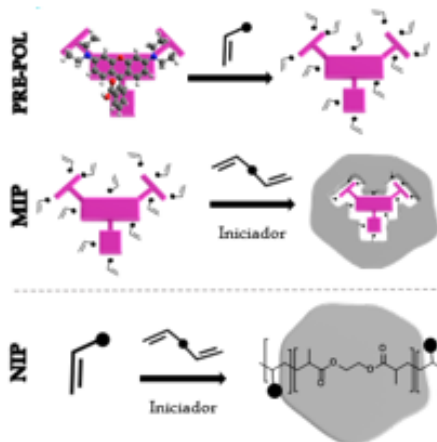
<i>Tabla 1. Perfiles del cáncer colorrectal para Colombia (2014) según la Organización Mundial de la Salud ((MINSALuD, 2018).....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 2. Promedio de tamaños de partícula MIP y NIP.....</i>	<i>47</i>

RESUMEN GRÁFICO

DINÁMICA MOLECULAR



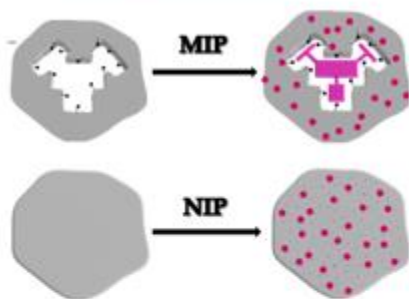
SÍNTESIS



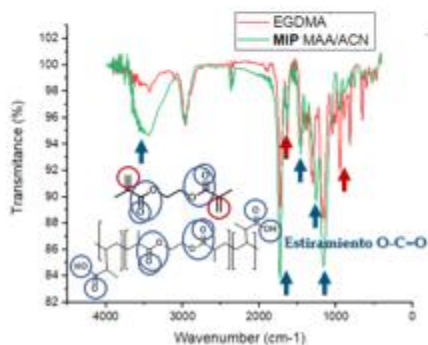
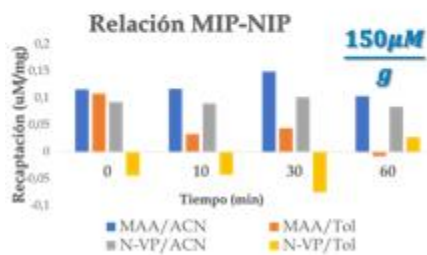
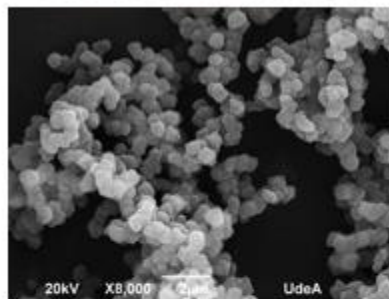
PURIFICACIÓN



RECAPTACIÓN



CARACTERIZACIÓN



RESUMEN

Actualmente el enfoque de muchas investigaciones químicas en el área de sensores es la creación de receptores sintéticos como los Polímeros de Impresión Molecular (MIPs), que imiten el comportamiento de reconocimiento natural antígeno-anticuerpo, ofreciendo potencialmente la especificidad y selectividad de los receptores biológicos, pero con una mejor durabilidad en condiciones ambientales y menor costo. El objetivo principal de esta investigación es realizar una prueba concepto en el diseño, síntesis y caracterización de este tipo de plataformas con moléculas relativamente pequeñas como lo es la Rodamina B (RhB), para su futura extrapolación a moléculas más grandes y complejas como las proteínas, en aplicaciones biomédicas. El diseño inicial de los MIP se realizó con simulaciones de dinámica molecular y detección computacional utilizando diferentes programas de uso libre (LAMMPS, Clúster de CRONOS EAFIT, LigParGen, Packmol y Moltemplate). Un grupo de 4 monómeros y 4 solventes diferentes fue empleado para identificar cuál combinación es capaz de interactuar mejor con la RhB, el ácido meta acrílico (MAA) o N-Vinilpirrolidona (N-VP) como monómeros funcionales y etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como entrecruzante en acetonitrilo y/o tolueno. Basados en los resultados de dinámica molecular, se prepararon las microesferas MIP usando RhB como plantilla y el método de polimerización en solución. Los polímeros se caracterizaron por Microscopía electrónica de barrido (SEM), Dispersión de luz dinámica (DLS), Espectroscopía infrarroja (IR) y análisis termogravimétrico (TGA). Posteriormente, la capacidad de adsorción y reconocimiento del MIP fueron estudiadas por Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-vis), en donde los MIP con MAA de geometría esférica y tamaños micrométricos mostraron una mayor recaptación de la RhB en solución, en comparación con los polímeros no impresos (NIP). Los resultados teóricos muestran que la mejor combinación para imprimir RhB es MAA en acetonitrilo como solvente, y esto fue corroborado experimentalmente.

ABSTRACT

Currently, the focus of many chemical investigations in the area of sensors is the creation of synthetic receptors such as Molecular Imprinted Polymers (MIPs), which mimic the natural antigen-antibody recognition behavior, potentially offering the specificity and selectivity of biological receptors, but with better durability in environmental conditions and lower cost. The main objective of this research is to carry out a concept test in the design, synthesis, and characterization of this type of platform with relatively small molecules such as Rhodamine B (RhB), for its future extrapolation to larger and more complex molecules such as proteins in biomedical applications. The initial design of the MIPs was carried out with molecular dynamics simulations and computational detection using different free-use programs (LAMMPS, EAFIT CRONOS Cluster, LigParGen, Packmol, and Moltemplate). A group of 4 monomers and 4 different solvents were used to identify which combination is able to interact better with RhB, meta acrylic acid (MAA) or N-vinylpyrrolidone (N-VP) as functional monomers, and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as a crosslinker in acetonitrile and/or toluene. Based on the results of molecular dynamics, the MIP microspheres were prepared by using RhB as a template and solution polymerization method. The polymers were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Dynamic Light Scattering (DLS), Infrared Spectroscopy (IR) and Thermogravimetric Analysis (TGA). Subsequently, the adsorption and recognition capacity of the MIP was studied by Ultraviolet Visible spectroscopy (UV-vis), where MIPs with MAA, spherical geometry and micrometric sizes showed greater reuptake of RhB in solution, compared to non-printed polymers (NIP). The theoretical results show that the best combination for printing RhB was MAA in acetonitrile as solvent, and this was experimentally corroborated.

1 MARCO TEÓRICO

La detección y sensado de nuestro entorno se ha vuelto una necesidad en el mundo moderno, lo que ha dado lugar a diferentes plataformas de detección como lo son: los metales nobles, Óxidos metálicos, Biomateriales, Nanomateriales de carbono y NANOMATERIALES POLIMÉRICOS.

Dentro de estos últimos se encuentran los polímeros impresos molecularmente o MIPs, en los cuáles nos enfocaremos durante todo este trabajo.

1.1 Polímeros de impresión molecular

Los polímeros de impresión molecular son receptores sintéticos o elementos de reconocimiento que sirven como sensores altamente específicos para un determinado analito objetivo (et.al, 2011) (Schirhagl, 2013) (Lingxin Chen, 2016). Estas matrices poliméricas son complementarias a una plantilla en tamaño, forma y disposición de grupos (Gizem Erturk., 2016), además esta red es lo suficientemente flexible para permitir la difusión de solventes y analitos dentro y fuera de él. (Nicole M. Bergmann, 2008).

Las características más prometedoras de estas plataformas son: alta selectividad, bajos límites de cuantificación, resistencia a la temperatura y presiones elevadas, resistencia física y bajos costos de producción.

Las principales estrategias sintéticas utilizadas en la preparación de polímeros orgánicos impresos se describen en términos de los principios químicos utilizados en la etapa de creación de plantillas. Estos se clasifican como covalentes (son más selectivos, pero pueden afectar funcionalidad de la cavidad), semi-covalente (se forman enlaces covalentes durante a impresión, pero se da unión no covalente entre el monómero y la plantilla), no covalente (facilitan la extracción de la plantilla), mediada por metal y no polar. (A.G. Mayes M. W., 2005) (A.G. Mayes M. J., 2005).

También se pueden clasificar según la técnica de polimerización ya sea: masa, precipitación, emulsión, suspensión o sol-gel. La técnica que se emplee va a depender de la naturaleza de la molécula plantilla que se quiera estudiar.

Las moléculas pequeñas como plantillas ya están muy estudiadas y sus síntesis están muy bien descritas. Por esta razón el nuevo enfoque es moverse hacia MIP selectivos para moléculas grandes y complejas (Nostrum, 2011) (Songjun Li, 2014). La albúmina de suero bovino (BSA), la lisozima y la hemoglobina bovina (BHb) son las más comunes en este tipo de estudios. (David R.Kryscio, 2012)

La gran mayoría de reportes referentes a MIPs son para moléculas sintéticas, sin embargo hay que destacar los esfuerzos de diferentes grupos para crear sistemas MIP completamente naturales mediante el uso de proteínas como elementos de reconocimiento para capturar moléculas de pequeño peso molecular, demostrando que los sistemas MIP naturales son posibles, y además tienen la posibilidad de simular eventos complejos de unión proteína-molécula para crear posibles sistemas de liberación de enzimas artificiales para el tratamiento de diversas enfermedades. Un ejemplo de esto se observa cuando Guoqi Fu, estudia geles de quitosán injertados con poliacrilamida con albumina de suero bobino como plantilla, estudio en el cual se mejora la eficiencia del gel injertándolo con el biopolímero quitosán (Guoqi Fu, 2007)

La amplia investigación en este tipo de plataformas de reconocimiento a dado lugar a diferentes aplicaciones tales como: Separación, adsorción, catálisis, sensores, administración de fármacos, entre otros.

1.1.1 Proceso de impresión molecular

La polimerización de un monómero se produce en presencia de la molécula diana (plantilla) que se incorpora en la matriz del polímero. El proceso comienza con la disolución de la plantilla, el monómero funcional, el agente de reticulación y el iniciador en un disolvente porógeno. Los monómeros funcionales se eligen para interactuar con la molécula plantilla, ya que la formación de un complejo estable de plantilla-monómero es fundamental para el éxito del reconocimiento molecular. Los monómeros se colocan espacialmente alrededor de la plantilla y la posición se fija mediante copolimerización con monómeros reticulantes. Posteriormente la eliminación de las moléculas de la plantilla del polímero, por lavado con disolvente, deja sitios de unión que son complementarios en forma a la plantilla. En

consecuencia, el polímero resultante reconoce y se une selectivamente a las moléculas de la plantilla (et.al, 2011). El proceso de impresión se representa en la Figura 1.

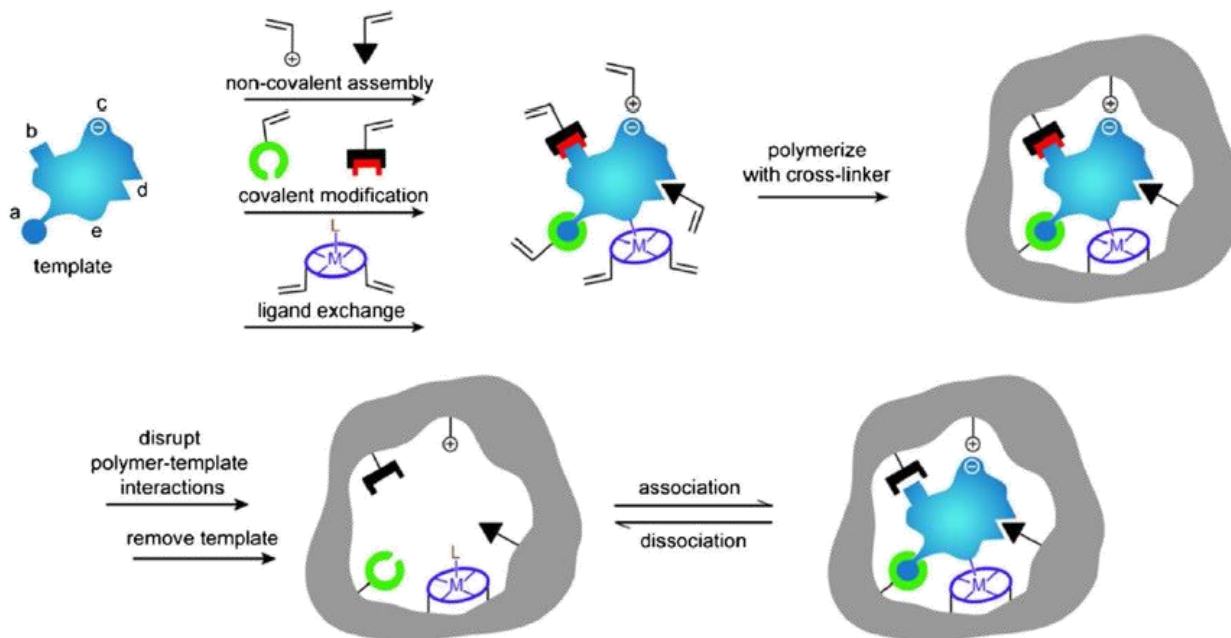


Figura 1. Representación esquemática del proceso de impresión molecular (A.G. Mayes M. J., 2005)

1.1.2 Optimización de la síntesis

En la síntesis de los MIP, se deben evaluar muchos parámetros, que pueden influir en la morfología, las propiedades y el rendimiento de los polímeros. En la síntesis de los MIP, la elección de los reactivos químicos es de primordial importancia para obtener MIP funcionales eficientes. (et.al, 2011) (Lingxin Chen, 2016) (Mariana Roberto Gama, 2017)

1.1.2.1 Monómeros funcionales

La elección del monómero es muy importante para crear cavidades altamente específicas diseñadas para la molécula de la plantilla. Los monómeros funcionales típicos se muestran en la Figura 2, pero los más comunes son ácidos carboxílicos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido vinilbenzoico), ácidos sulfónicos (ácido 2-acrilamido-2-metilpropano

sulfónico), y bases heteroaromáticas (vinilpiridina, vinilimidazol) (Mariana Roberto Gama, 2017) (Lingxin Chen, 2016)

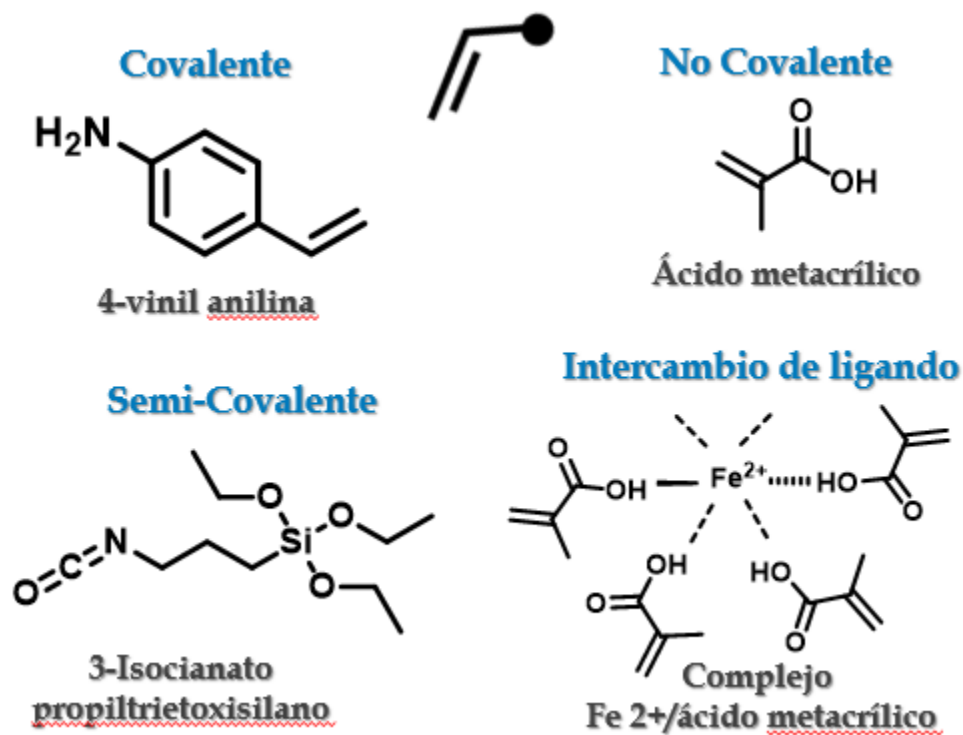


Figura 2. Estructuras químicas de los monómeros más utilizados. A: Impresión covalente, B: Impresión no covalente, C: Semi covalente, D: Intercambio de ligando (Lingxin Chen, 2016)

1.1.2.2 Entrecruzantes

El entrecruzante es importante para controlar la morfología de la matriz polimérica, estabilizar los sitios de unión impresos e impartir estabilidad mecánica a la matriz polimérica para retener su capacidad de reconocimiento molecular. Los entrecruzantes más empleados son el etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) y el trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM). En la Figura 3 se pueden observar los entrecruzantes empleados según el tipo de impresión. (Lingxin Chen, 2016) (Mariana Roberto Gama, 2017)

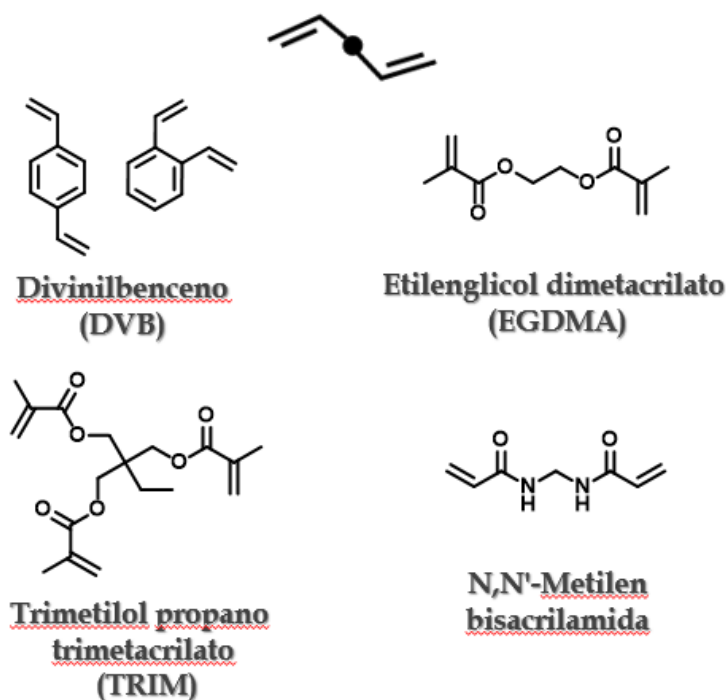


Figura 3. Estructuras químicas de los entrecruzantes más utilizados. A: Impresión covalente, B: Impresión no covalente, C: impresión sol-gel, D: Nuevos entrecruzantes (Lingxin Chen, 2016)

1.1.2.3 Solventes

Los solventes más utilizados para la síntesis de MIP son tolueno, cloroformo, diclorometano o acetonitrilo. El solvente sirve para reunir todos los componentes (monómero, plantilla, iniciador, reticulante) en una fase en la polimerización y es responsable de crear los poros en polímeros macroporosos. El solvente debe producir poros grandes para asegurar un buen flujo a través de la matriz polimérica. Por esta razón, es bastante común referirse al solvente como el "porógeno". (Lingxin Chen, 2016)

En impresiones no covalentes se usan los solventes menos polares para facilitar las interacciones como enlaces de hidrógeno; mientras que los solventes más polares se emplean para impresiones covalentes o semi covalentes. (Mariana Roberto Gama, 2017)

1.1.2.4 Iniciadores

La gran mayoría de los MIP se preparan mediante polimerización por radicales libres, fotopolimerización y electropolimerización. Aparte de los compuestos peroxi, los

compuestos azo se usan ampliamente como iniciadores (Lingxin Chen, 2016) (Mariana Roberto Gama, 2017), entre ellos los compuestos en la Figura 4, adicionando el azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (ABCN), iniciador bastante conveniente por sus largos tiempos de vida media a temperaturas altas (Tehila Shahar, 2016).

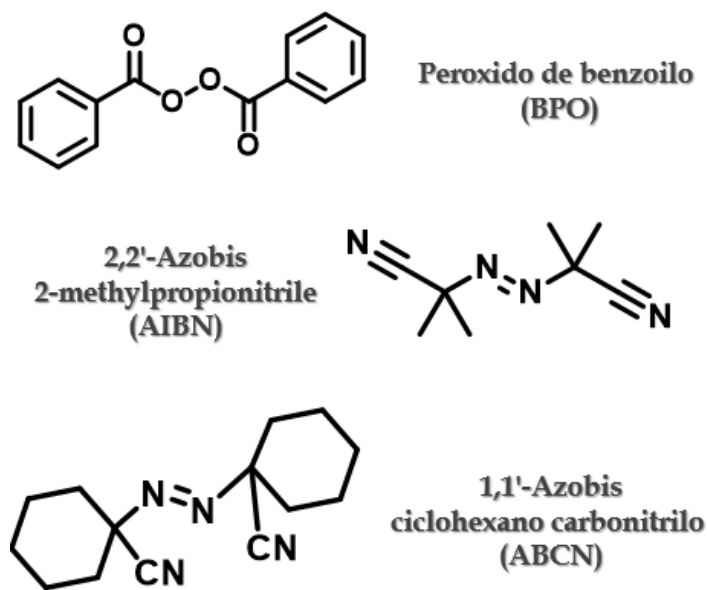


Figura 4. Estructuras químicas de los iniciadores más comunes (Lingxin Chen, 2016)

1.1.2.5 Plantilla

En general, una molécula de plantilla ideal debe satisfacer tres requisitos:

- Tener grupos funcionales que no eviten la polimerización
- Exhibir una excelente estabilidad química durante la reacción de polimerización
- Contener grupos funcionales que puedan formar complejos con monómeros funcionales.

Hasta ahora, los MIP se han aplicado con éxito para el reconocimiento y detección de una amplia gama de moléculas orgánicas pequeñas (iones, fármacos, aminoácidos, bases nucleótidas, pesticidas, coenzimas, etc). Sin embargo, la impresión de proteínas y otras biomacromoléculas sigue siendo un gran desafío. (Lingxin Chen, 2016)

1.1.3 Técnicas de impresión

La integración de los MIPs a plataformas transductoras ha sido bastante problemática debido a que no existen protocolos para la integración del MIP a detectores ópticos y electroquímicos que transformen las interacciones en señales eléctricas detectables. (Canfarotta, 2018)

Este aspecto puede resolverse usando MIPs de tamaño nanométrico (Piletska, 2017) (SubramanianViswanathan, 2012) (Sposito AJ, 2018) y empleando técnicas de impresión especiales usadas en la preparación de biosensores para el reconocimiento de proteínas (Songjun Li, 2014) (David R.Kryscio, 2012) (A. Bossi, 2007) (Gizem Erturk., 2016):

- Reconocimiento mediante la colocación de unas pocas restricciones sobre el polímero
- Reconocimiento a través de geles de poliacrilamida (HydroMIPs) (Daniel M. Hawkins, 2005)
- Enfoque de epítipo: Explotar un pequeño elemento estructural de la proteína para su reconocimiento completo
- Polímeros estampados molecularmente injertados en la superficie
- Inmovilización de la plantilla sobre la superficie
- Materiales a base de sílice impresos para el reconocimiento de proteínas

El enfoque en la superficie de las técnicas anteriores resuelve este problema en gran medida; ya que garantiza que todas las cavidades impresas estén ubicadas en la superficie del polímero y, por lo tanto, sean de fácil acceso para las moléculas de analito. (Marcin Dabrowski, 2018)

1.1.3.1 Sensado químico y biológico

El empleo de MIPs como materiales de detección ha logrado un gran avance gracias a su alta selectividad, estabilidad, simplicidad, costo-efectividad y versatilidad en campos como el diagnóstico clínico, el control ambiental, el análisis de alimentos y la selección de medicamentos. La característica de los sensores basados en MIP es que los MIP tienen propiedades de reconocimiento y transducción, es decir, los MIP como elementos de reconocimiento pueden vincular específicamente los analitos objetivos y como los elementos

de transducción, pueden generar señales de salida para la detección. La construcción de estos sensores basados en MIP se muestra en la Figura 5.

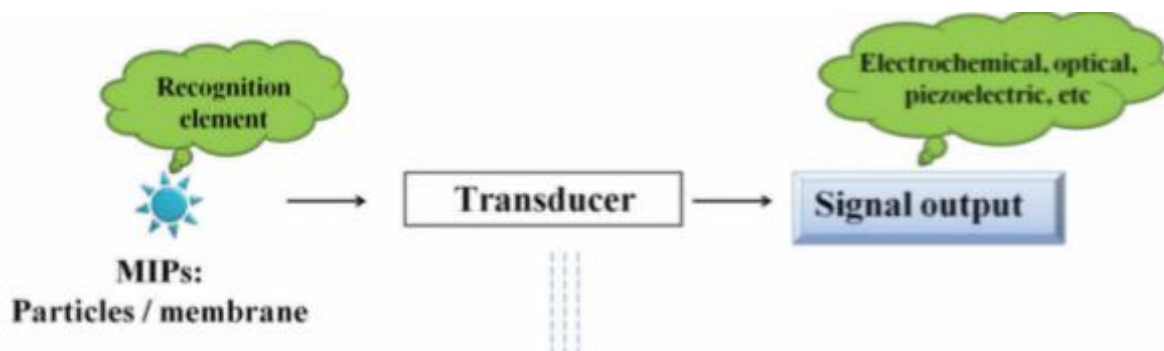


Figura 5. Representación esquemática de la construcción de un sensor basado en MIP (Lingxin Chen, 2016)

Se observa en la figura que las señales de detección de salida pueden clasificarse en 3 tipos, tipos electroquímicos (electrodos), ópticos (transponedores) y piezoeléctricos (cristales) de acuerdo con el mecanismo de transducción y el transductor empleado. En general, para la determinación analítica, es necesario considerar los principales parámetros de los sensores basados en MIP, como el tiempo de respuesta, el rango dinámico lineal, la detectabilidad, la sensibilidad, la selectividad y la reproducibilidad.

Adicionalmente teniendo cuenta los parámetros anteriores se pueden clasificar los tipos de señales en:

- Electroquímicas (Conductividad, Impedancia, potenciometría, corriente eléctrica)
- Por fluorescencia
- Quimioluminiscencia
- Colorimetría
- Resonancia de superficie de plasma

Esta clasificación depende directamente del tipo de analito y sus características, como del tipo de técnica de polimerización empleada para la síntesis del MIP. (Lingxin Chen, 2016)

1.1.4 Aspectos críticos

El proceso de impresión molecular presenta varias ventajas, como se describió anteriormente, pero también deben considerarse algunos inconvenientes, en especial en el diseño de MIPs para macromoléculas (Nostrum, 2011) (Songjun Li, 2014) (et.al, 2011). Los desafíos principales de la impronta se enumeran a continuación: Composición del polímero (La selección de monómeros se optimiza utilizando modelos moleculares (Piletska, 2017) (Canfarotta, 2018)), control de variables, remoción de plantillas (lavados), evaluación de recaptación (cuantificación) y desarrollo de polímeros compatibles con agua.

El reto más grande sería la compatibilidad con agua debido al enfoque de la propuesta. Estos polímeros son complejos de sintetizar en medios acuosos debido a que las plantillas muy polares son insolubles en medios orgánicos y a la vez inestables en estos medios. Además, las moléculas de agua usualmente interfieren en la polimerización formando interacciones muy fuertes con la plantilla y/o el monómero (Zhang, 2014). Sin embargo, se han investigado diferentes técnicas para abordar experimentalmente este problema (Zhang, 2014). Estas técnicas son:

- Impresión convencional optimizando las condiciones de enlace
- Uso de monómeros polimerizables especiales
- Modificaciones superficiales posteriores (Grafting, introducción de grupos funcionales)
- Polimerización de emulsiones Pickering interfacial
- Geles o hidroMIPs (estructura suave y macroporosa permite que grandes proteínas entren y salgan (Xingshou Pang, 2006))
- Polimerización por precipitación de radicales vivientes controlada (CRPP)

El uso de estas técnicas ha arrojado resultados positivos, en los cuáles la adición de agua al medio de reacción mejora la capacidad de adsorción y selectividad (Chih-Hsien Hu, 2008)

1.2 Polímeros de impresión molecular como biosensores

1.2.1 Biomoléculas y receptores biológicos

Las moléculas o recubrimientos con alta selectividad, como anticuerpos o enzimas, son de gran importancia en química, diagnóstico, y biología. Sin embargo, estos receptores naturales son caros o difíciles de producir. Además, dado que son biomoléculas, su vida útil y su aplicabilidad son limitadas (Schirhagl, 2013). Cada sistema corporal se basa en macromoléculas, propiamente en proteínas para funcionar, y la forma en que las proteínas reconocen otras moléculas es parte integral de esos sistemas. (Nicole M. Bergmann, 2008)

La mayoría de los biomarcadores del cáncer son proteínas simples o conjuntos moleculares basados en proteínas. Estos biomarcadores son críticos, no solo para el diagnóstico de cáncer, sino también para controlar su respuesta al tratamiento. Los métodos modernos de alto rendimiento han acelerado el ritmo del descubrimiento de biomarcadores lo cual requiere el desarrollo de ensayos rápidos, simples y confiables para su detección y cuantificación en fluidos y tejidos biológicos. El proceso de impresión molecular (IM) con materiales artificiales proporciona una alternativa para la detección de una amplia gama de sustancias. (Piletska, 2017) (Steven A.Soper, 2006) (Yantian Wang, 2010) (SubramanianViswanathan, 2012) (Cecilia Rossetti, 2014)

Sin embargo, las proteínas son compuestos solubles en agua, que además tienen una estructura y conformación flexibles, y un gran número de grupos funcionales disponibles para la interacción con monómeros funcionales. Lo que representa cierto grado de incompatibilidad con la tecnología MIP convencional, pues esta es basada en el uso de disolventes orgánicos y condiciones fuertes para la preparación de polímeros, lo que puede afectar las proteínas por los cambios en la temperatura o en el ambiente. (A. Bossi, 2007) (Nicole M. Bergmann, 2008)

1.3 Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la cual algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse descontroladamente y se diseminan a los tejidos aledaños, dando lugar en muchas ocasiones a tumores. Esta es la segunda causa de muerte alrededor del mundo, y en el año 2015 ocasionó

cerca de 8,8 millones de defunciones; además se prevé que el número de casos nuevos de cáncer aumente a cerca de 23,6 millones para 2030 según estadísticas del instituto nacional del cáncer de Estados Unidos.

Los tipos de cáncer que causan mayor número de fallecimientos según la organización mundial de la salud son el pulmonar, hepático y colorrectal, este último con un total de 774,000 defunciones anuales. El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más común en hombres y el segundo más común en mujeres a nivel mundial, su incidencia y mortalidad está relacionado con el índice de desarrollo humano donde los países más desarrollados son más propensos a presentar este tipo de cáncer. En 2018 se estimaron 140250 casos nuevos y fue causante de 50630 muertes.

Este tipo de cáncer a menudo comienza como un crecimiento, que se llama pólipo, en el colon o en el recto, el cual toma de 10 a 15 años para convertirse en cáncer. Es posible prevenirlo si se detectan y extirpan los pólipos a tiempo; pero el CCR **no puede ser detectado por el sistema inmunológico**, por lo cual, únicamente 4 de cada 10 casos se detectan en la etapa inicial.

Los métodos de detección disponibles hoy día son exámenes costosos, de larga duración y en su mayoría traumáticos e invasivos para el afectado, los cuales, por ignorancia de los mismos pacientes no son solicitados a tiempo por los médicos. Como no son exámenes típicos de rutina, se practican cuando los síntomas son muy graves, lo que representa una alta probabilidad de que el cáncer se encuentre en sus etapas avanzadas.

La interleucina 4 (IL-4) ha sido reportada como biomarcador (receptor biológico) del CCR; esta es una proteína sobre expresada en mucha mayor cantidad en células cancerígenas que en células normales. Lo cual nos permite inferir, que el desarrollo de un biosensor que permita detectar esta proteína conllevaría a una nueva alternativa de detección para esta enfermedad.

Con base en lo anterior, existe un marcado interés por la comunidad científica en desarrollar ensayos rápidos, simples y confiables para la detección rápida y eficaz del CCR, lo cual se puede lograr a través del desarrollo de biosensores que permitan identificar biomarcadores

moleculares que pueden analizarse potencialmente a través de diferentes plataformas de detección para la clasificación de tumores, guiando así el diagnóstico, pronóstico, monitoreo del tratamiento y recurrencia de la enfermedad.

Ahora, si bien los biosensores se han convertido en herramientas valiosas en el arsenal del clínico para tratar a los pacientes con cáncer, se requieren nuevos formatos. Y en la búsqueda de estas alternativas mejoradas, surgen los polímeros impresos molecularmente (MIPs); matrices poliméricas porosas con elementos de reconocimiento específicos que a través de la introducción de funcionalidades químicas imitan el reconocimiento biológico. Esta red tridimensional acoplada a una plataforma transductora permite enfoques más prometedores para la preparación de sensores de proteínas.

Actualmente no existen reportes de investigaciones enfocadas en la detección del CCR por medio de MIPs con interleucinas. Por lo tanto, se propone la síntesis de un MIP con IL-4 como molécula objetivo (plantilla), con la respectiva caracterización y evaluación de desempeño comparada con un polímero sin impresión molecular (NIP) que actuará como un blanco. El desarrollo exitoso de este trabajo permite el fomento del desarrollo científico y médico de la región, y adicionalmente generará un impacto social muy grande, pues la detección temprana es sumamente crucial para los resultados positivos de un tratamiento.

1.3.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la alteración en los mecanismos de regulación del ciclo celular, donde ocurre la pérdida de control en el crecimiento y división de las células, las cuales presentan un inmenso potencial para la auto renovación y proliferación que con lleva a la invasión y destrucción de los tejidos adyacentes. Este grupo de células pueden formar masas sólidas que aumentan de tamaño conocidas como tumores o pueden alcanzar los vasos sanguíneos y extenderse a otras regiones del cuerpo generando el proceso de metástasis, que es la causa del 90% de muertes relacionadas con el cáncer. (Jordan, Guzman, & Noble, 2006) (Avendano & Menéndez, 2008)

A nivel mundial el cáncer es la principal causa de morbilidad y mortalidad, y la segunda principal causa de muerte. Existen muchos tipos de cáncer, entre los principales se tiene el

de pulmón, hígado, estómago, mama (seno), y colorrectal, este último es la tercera principal causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo con 774.000 defunciones en el 2015.

El cáncer afecta a las poblaciones de bajos y medianos ingresos ((WHO), s.f.), sin embargo, en el cáncer colorrectal, se observa que a medida que aumenta el índice de desarrollo humano (HDI) de la población, la incidencia y mortalidad de este cáncer también aumenta. Las defunciones provocadas por el cáncer colorrectal en 2012 fueron los siguientes (Tabla 1). Para el departamento de Antioquia se reporta el valor de una tasa ajustada de mortalidad de un 7,04 para el año 2014. ((MINSALuD, 2018)

Tabla 1. Perfiles del cáncer colorrectal para Colombia (2014) según la Organización Mundial de la Salud ((MINSALuD, 2018)

	Hombres	Mujeres
Casos reportados	2,632	2,209
Número de muertes	1,428	1,711

1.3.2 Cáncer colorrectal

El colon y el recto constituyen el grupo del intestino. El colon está dividido en cuatro segmentos: Ascendente, transverso, descendente y sigmoides como se muestra en la Figura 6. (Ribeiro, s.f.)

El colon y el recto están compuestos por varias capas. El cáncer colorrectal comienza en la parte más interna del colon y el recto. Cuando las células sufren alteraciones en los genes supresores tumorales y en los oncogenes comienza el crecimiento descontrolado y forman pequeños grupos de células llamados “Pólipos”. No todos los pólipos son cancerosos, algunos cambian a cáncer luego de varios años, los tipos de pólipos son:

Pólipo adenomatoso (Adenoma): Denominado condición precancerosa.

Pólipos hiperplásicos e inflamatorios: Son comunes, pero no precanceroso.

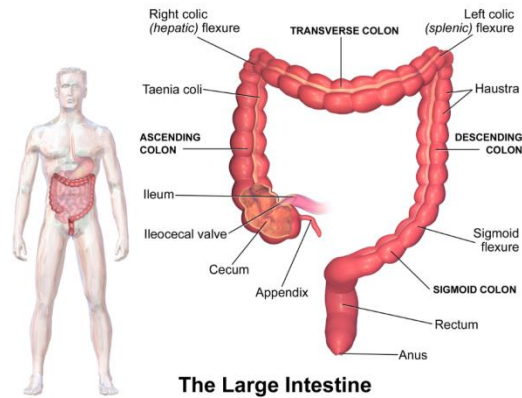


Figura 6. Diagrama de las partes del intestino grueso

Una vez se tiene la condición precancerosa, se pueden generar varios tipos de cáncer en el colon o el recto, como son:

Adenocarcinoma: Es el más común, componen más del 95% de cáncer colorrectal, comenzando en las células epiteliales que forman el revestimiento interior de colon y recto, encargadas de generar la mucosa para la lubricación del intestino grueso.

Los otros son menos comunes, en los que se encuentran: Tumores carcinoides, tumores estromales gastrointestinales, linfomas y sarcomas. (Society, About Colorrectal Cancer, s.f.)

Los procesos que sufren las células epiteliales para la formación de un adenoma hasta la metástasis del cáncer se conocen como “Tumorigénesis” (Figura 7).

Cuando las células sufren la inestabilidad genética forman el pólipo (condición precancerosa), formando el adenoma temprano, el cual comienza a crecer formando un adenoma tardío, que comienza a invadir las capas externas del colon o recto para componer un adenocarcinoma o carcinoma, el cual continúa creciendo hasta alcanzar vasos sanguíneos o linfáticos los cuales transportan fluidos y residuos del tumor ocasionando la condición de metástasis.

Tres fases son observadas en este cáncer: la *iniciación*, un proceso rápido de pocos días donde ocurren los daños genotóxicos, la *promoción*, que puede durar entre 10 a 20 años; y la *progresión* que consiste en la etapa de carcinoma-metástasis, proceso que dura entre 1-5 años. (Jordan, Guzman, & Noble, 2006) (Society, About Colorrectal Cancer, s.f.)

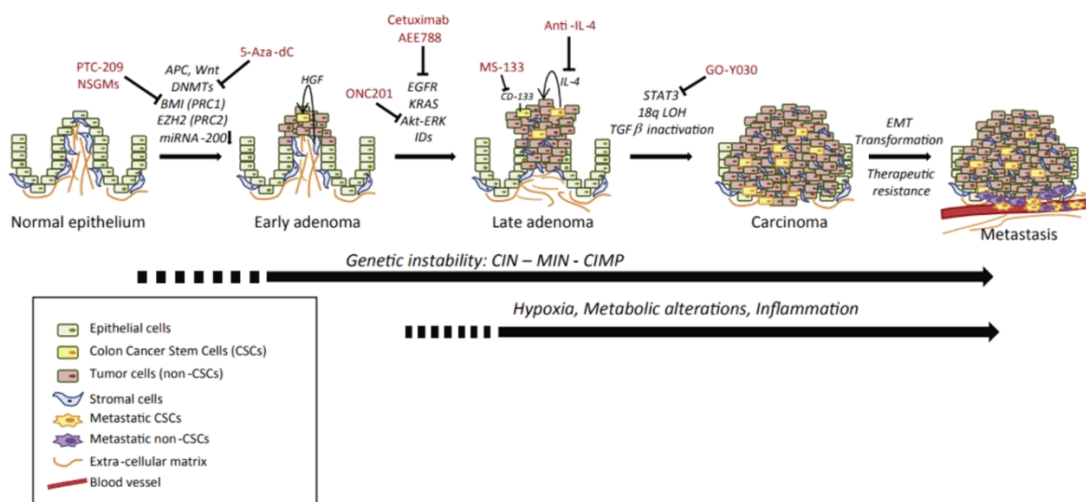


Figura 7. Esquema de las vías del cáncer en la tumorigénesis. Cancer Stem Cells;2006; Vol. 1.(p.182) (Jordan, Guzman, & Noble, 2006)

El cáncer colorrectal es una enfermedad muy compleja para tratar, no solo por su capacidad de immortalizar y continuar dividiéndose sin cesar sino por su capacidad de evitar ser reconocida por el sistema inmunológico donde las células cancerosas crean un microambiente inmunosupresor dentro del tumor que permite escapar de la vigilancia inmune. Los macrófagos asociados a tumores inmuno-supresores y las células T reguladoras que residen en tumores, y sus productos, junto con productos derivados de tumores, crean un microambiente que contrarresta la activación y el ataque inmunológico. Para contrarrestar estas características existen una serie de terapias unas convencionales y otras más modernas para el tratamiento de pacientes con cáncer, incluidos los que tienen cáncer colorrectal, estas dependen de la etapa del cáncer y del grado de complicaciones que se presenten. Todas las terapias tienen su propia tasa de éxito y limitaciones. (Mishra, Drummond, Quazi, Karanki, & Shaw, 2013)

1.3.3 Detección

Las pruebas y exámenes de detección se realizan como parte del proceso de determinar la presencia de cáncer en las personas que no presentan ningún síntoma. Se pueden usar varias pruebas para detectar el cáncer colorrectal. (Society, Detección temprana, diagnóstico y clasificación por etapas, s.f.) Estas pruebas pueden ser divididas en dos grupos principales:

-Pruebas de heces fecales: Por medio de estas pruebas se examinan las heces fecales (excremento) para saber si hay signos de cáncer. Estas pruebas son menos invasivas y fáciles de realizar, pero necesitan realizarse con más frecuencia.

-Exámenes visuales (estructurales): Con estas pruebas se observa la estructura del colon y el recto para detectar cualquier área anormal. Se puede hacer con un endoscopio (un instrumento parecido a un tubo con una cámara diminuta y una fuente de luz en el extremo) que se inserta en el recto o con estudios por imágenes especiales (rayos X).

1.3.3.1 Pruebas de heces fecales

Por medio de estas pruebas se examinan las heces fecales (excremento) para saber si hay posibles signos de cáncer colorrectal (o pólipos). Este tipo de pruebas se describen a continuación

Prueba inmunoquímica fecal (FIT): Una manera de realizar una prueba para el cáncer colorrectal consiste en detectar sangre oculta en las heces fecales. Este tipo de prueba se hace porque a menudo los vasos sanguíneos más grandes de los pólipos o los cánceres colorrectales son frágiles y se lesionan fácilmente durante el paso del excremento. Por lo general, los vasos dañados liberan sangre en el colon o el recto, pero sólo en pocas ocasiones hay suficiente sangre visible en el excremento.

Prueba de sangre oculta en heces basada en guayacol (gFOBT): Esta prueba detecta sangre oculta en el excremento a través de una reacción química, de una manera diferente que la prueba FIT. Pero al igual que la FIT, esta prueba no puede indicar si la sangre proviene del colon o de otras partes del tracto digestivo (por ejemplo, el estómago).

Prueba de ADN en las heces fecales: Una prueba de ADN en las heces fecales (también conocida como prueba multidirigida de ADN en heces fecales o MT-sDNA) identifica ciertas secciones anormales de ADN provenientes del cáncer o de células de pólipos. Casi siempre, las células de los cánceres colorrectales o de los pólipos contienen mutaciones de ADN (cambios) en ciertos genes. Las células con estas mutaciones en ocasiones llegan hasta las heces fecales, y las pruebas pueden detectarlas.

1.3.3.2 Exámenes visuales (estructurales)

Con estas pruebas se observa la estructura del interior del colon y del recto para detectar cualquier área anormal que pueda ser cáncer o pólipos. Estas pruebas se pueden hacer con menos frecuencia que las pruebas de heces fecales, pero requieren más preparación con anticipación. Además, puede que haya algunos riesgos que no se presentan con las pruebas de heces fecales. Estas se clasifican en:

Colonoscopia: Para este examen, el médico examina el colon y el recto en toda su extensión con un colonoscopio, un tubo flexible del grosor aproximado de un dedo que tiene una luz y una pequeña cámara de video en el extremo. Se introduce por el ano hacia el recto y el colon. A través del colonoscopio, se pueden pasar instrumentos especiales para hacer una biopsia (muestra) o extirpar cualquier área que se vea sospechosa, como pólipos, de ser necesario.

Colonografía por CT (colonoscopia virtual): Este examen es un tipo avanzado de tomografía computarizada del colon y del recto. En la colonografía por CT, unos programas especiales de computadora crean imágenes radiológicas en dos dimensiones y una vista tridimensional del interior del colon y del recto, lo que permite al médico detectar pólipos o cáncer. Este estudio se puede usar especialmente en las personas que no pueden o no quieren someterse a un examen más invasivo, como una colonoscopia. Se puede realizar con bastante rapidez y no requiere de un sedante.

Sigmoidoscopia flexible: Permite observar parte del colon y del recto con un tubo flexible del grosor aproximado de un dedo que tiene una fuente de luz y una pequeña cámara de video en el extremo. El sigmoidoscopio se introduce por el ano y se dirige al recto para llegar a la parte inferior del colon. Las imágenes que se obtienen del endoscopio se observan en una pantalla de video.

1.3.4 Interleucinas

Una interleucina es un tipo de citosina, también llamadas IL. Pertenecen a un grupo de proteínas relacionadas que elaboran los leucocitos (glóbulos blancos) y otras células del cuerpo. Estas regulan las respuestas inmunitarias, las funciones de las células, diversos genes y factores genéticos. Son encargadas de la comunicación intercelular, la activación de

receptores, proliferación y diferenciación celular y la regulación de mecanismos de inflamación

El sistema inmune depende en gran parte de ellas; por ello las interleucinas que se producen en el laboratorio se usan en el tratamiento de cáncer como modificador de la respuesta biológica para estimular el sistema inmunitario. (cáncer, s.f.)

Se conocen en la actualidad no menos de 33 interleucinas, las cuales difieren entre sí tanto desde el punto de vista químico como del biológico. El genoma humano puede codificar más de 50 interleucinas y proteínas relacionadas. (Abbas. A, 2008) (Schmitz J, 2005)

1.3.4.1 Interleucina 4

La interleucina-4 (IL-4) es un regulador clave del sistema inmunológico y un factor importante en el desarrollo de hipersensibilidad alérgica. (Kraich M, 2006) Esta proteína tiene muchas funciones biológicas y es un regulador clave en inmunidad humoral y adaptativa.

Es una proteína de 1063 átomos, 129 residuos y un peso molecular de 15000 g/mol (Kraich M, 2006). En su estructura tiene un pliegue globular compacto (similar a otras citoquinas), estabilizado por 3 enlaces disulfuro; la mitad de la estructura está dominada por un paquete de 4 hélices alfa con un giro hacia la izquierda. Estas hélices son anti-paralelas, con 2 conexiones por encima de la cabeza, que caen en una lámina beta anti-paralela de 2 hilos (Ver Figura 8). (Walter MR, 1992)

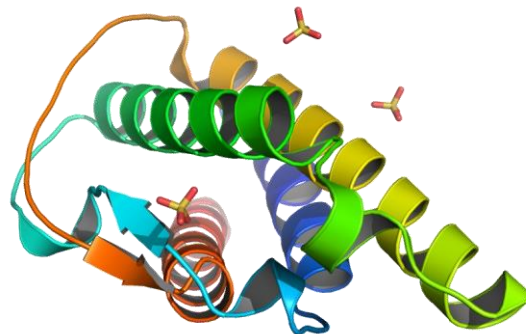


Figura 8. Estructura tridimensional de la Interleukin 4 (2B8U) humana de tipo salvaje (Kraich M, 2006)

Adicionalmente con la ayuda de simuladores (Pymol) se puede conocer la superficie de potencial de esta proteína como se muestra en la Figura 9, a través de la cual se puede determinar la naturaleza de los grupos más expuestos en la superficie.

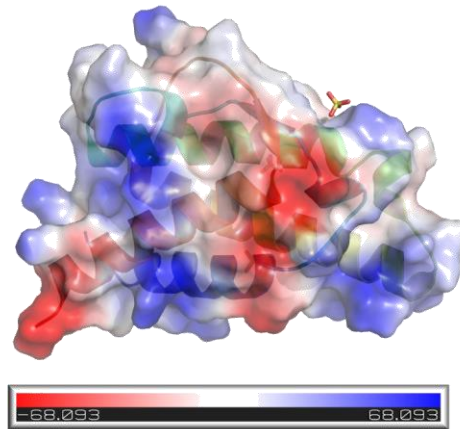


Figura 9. Superficie de potencial de la proteína 2B8U. Secciones azules representan fracciones positivas y secciones rojas fragmentos negativos. A su vez, los segmentos blancos representan los neutros

1.3.4.2 IL-4 como biomarcador del cáncer colorrectal

La IL-4 juega un papel importante en el desarrollo de ciertos trastornos inmunes, particularmente alergias y algunas enfermedades autoinmunes.

La IL-4 tiene un efecto significativo en la progresión del tumor. Se encontró un aumento en la producción de IL-4 en el seno, próstata, pulmón, células renales y otros tipos de cáncer como el CCR. Se ha encontrado mucha sobreexpresión de IL-4R en muchos tipos de cáncer. Las células renales y el glioblastoma modifican 10,000-13,000 receptores por célula dependiendo del tipo de tumor. IL-4 puede motivar primitivamente a las células tumorales y aumentar su resistencia a la apoptosis al aumentar el crecimiento del tumor. (UI-Haq, Naz, & Mesaik, 2016) (Li, y otros, 2008)

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una enfermedad en la cual algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse descontroladamente y se diseminan a los tejidos aledaños, dando lugar en muchas ocasiones a tumores. Esta es la segunda causa de muerte alrededor del mundo, y en el año 2015 ocasionó cerca de 8,8 millones de defunciones; además se prevé que el número de casos nuevos de cáncer aumente a cerca de 23,6 millones para 2030 según estadísticas del instituto nacional del cáncer de Estados Unidos.

Los tipos de cáncer que causan mayor número de fallecimientos según la organización mundial de la salud son el pulmonar, hepático y colorrectal, este último con un total de 774,000 defunciones anuales. El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más común en hombres y el segundo más común en mujeres a nivel mundial, su incidencia y mortalidad está relacionado con el índice de desarrollo humano donde los países más desarrollados son más propensos a presentar este tipo de cáncer. En 2018 se estimaron 140250 casos nuevos y fue causante de 50630 muertes.

Este tipo de cáncer a menudo comienza como un crecimiento, que se llama pólipo, en el colon o en el recto, el cual toma de 10 a 15 años para convertirse en cáncer. Es posible prevenirlo si se detectan y extirpan los pólipos a tiempo; pero el CCR **no puede ser detectado por el sistema inmunológico**, por lo cual, únicamente 4 de cada 10 casos se detectan en la etapa inicial.

Los métodos de detección disponibles hoy día son exámenes costosos, de larga duración y en su mayoría traumáticos e invasivos para el afectado, los cuales, por ignorancia de los mismos pacientes no son solicitados a tiempo por los médicos. Como no son exámenes típicos de rutina, se practican cuando los síntomas son muy graves, lo que representa una alta probabilidad de que el cáncer se encuentre en sus etapas avanzadas.

La interleucina 4 (IL-4) ha sido reportada como biomarcador (receptor biológico) del CCR; esta es una proteína sobre expresada en mucha mayor cantidad en células cancerígenas que en células normales. Lo cual nos permite inferir, que el desarrollo de un biosensor que

permita detectar esta proteína conllevaría a una nueva alternativa de detección para esta enfermedad.

Con base en lo anterior, existe un marcado interés por la comunidad científica en desarrollar ensayos rápidos, simples y confiables para la detección rápida y eficaz del CCR, lo cual se puede lograr a través del desarrollo de biosensores que permitan identificar biomarcadores moleculares que pueden analizarse potencialmente a través de diferentes plataformas de detección para la clasificación de tumores, guiando así el diagnóstico, pronóstico, monitoreo del tratamiento y recurrencia de la enfermedad.

Ahora, si bien los biosensores se han convertido en herramientas valiosas en el arsenal del clínico para tratar a los pacientes con cáncer, se requieren nuevos formatos. Y en la búsqueda de estas alternativas mejoradas, surgen los polímeros impresos molecularmente (MIPs); matrices poliméricas porosas con elementos de reconocimiento específicos que a través de la introducción de funcionalidades químicas imitan el reconocimiento biológico. Esta red tridimensional acoplada a una plataforma transductora permite enfoques más prometedores para la preparación de sensores de proteínas.

Actualmente no existen reportes de investigaciones enfocadas en la detección del CCR por medio de MIPs con interleucinas. Por lo tanto, se propone la síntesis de un MIP con IL-4 como molécula objetivo (plantilla), con la respectiva caracterización y evaluación de desempeño comparada con un polímero sin impresión molecular (NIP) que actuará como un blanco. El desarrollo exitoso de este trabajo permite el fomento del desarrollo científico y médico de la región, y adicionalmente generará un impacto social muy grande, pues la detección temprana es sumamente crucial para los resultados positivos de un tratamiento.

Sin embargo, debido a la complejidad para imprimir proteínas es necesario diseñar con la ayuda de la dinámica molecular un MIP para plantillas más pequeñas y disponibles como la RhB. Un colorante ampliamente usado en la industria que ya tiene reportes como cancerígeno y tóxico (Figura 10)

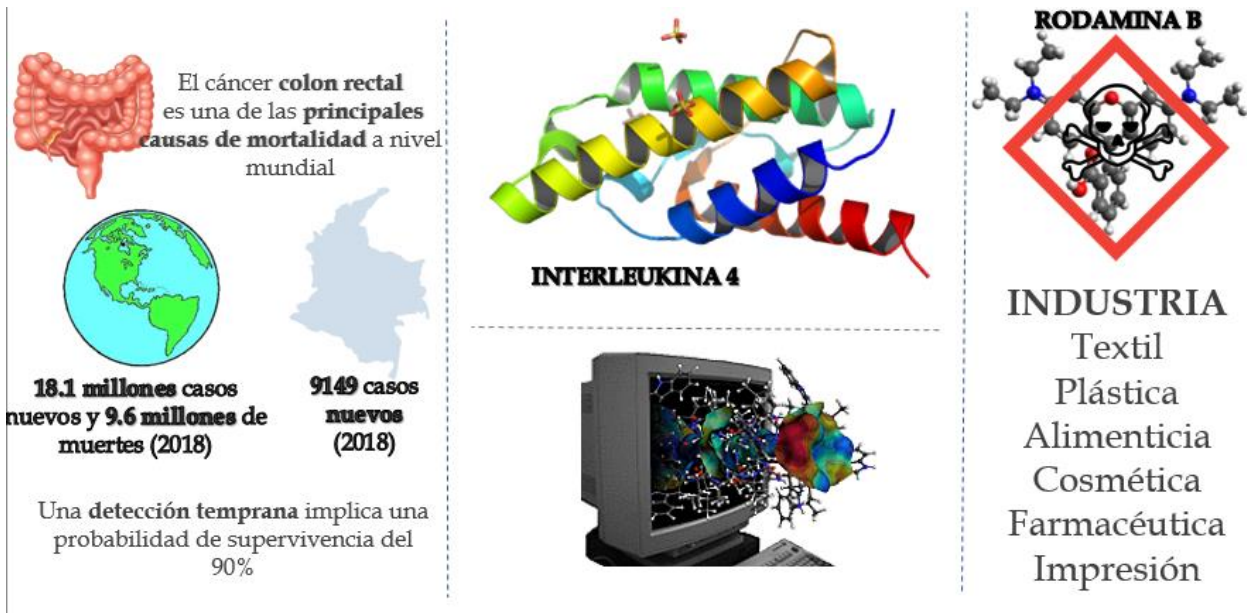


Figura 10. Planteamiento del problema

4 HIPÓTESIS

Polímeros sintetizados a partir de monómeros y solventes que exhiben buena interacción con la plantilla Rodamina B dan lugar a plataformas de reconocimiento tipo polímeros impresos molecularmente (MIP) que presentan mayor recaptación en comparación con los polímeros no impresos (NIP)

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Desarrollar una prueba concepto en el diseño, síntesis y caracterización de Polímeros impresos molecularmente (MIPs) con moléculas relativamente pequeñas como lo es la Rodamina B (RhB), para su futura extrapolación a moléculas más grandes y complejas como las proteínas con potenciales aplicaciones biomédicas

5.2 Objetivos Específicos

- Analizar por dinámica molecular las interacciones monómero-solvente con la Rodamina B para la formación de los sitios de reconocimiento (cavidades).
- Seleccionar los monómeros y solventes que presenten mejor interacción con la plantilla.
- Optimizar las condiciones de reacción: tiempo, temperatura, volumen, relación monómero-entrecruzante, concentración de la plantilla y contenido de sólidos.
- Sintetizar a partir de los monómeros y solventes seleccionados, los MIP con rodamina B y sus respectivos NIP como control
- Realizar pruebas de recaptación que verifiquen el desempeño de los MIP en comparación con los NIP
- Caracterizar las propiedades de los polímeros obtenidos (MIP y NIP)

6 METODOLOGÍA

6.1 Dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se desarrollan utilizando el programa de uso libre LAMMPS (Large-scale Atomic/Molecular Massively Parallel Simulator) por sus siglas en inglés, el cual es distribuido por el Laboratorio Nacional de Sandía y hace parte del Departamento de Energía de los Estados Unidos. Para ejecutar las simulaciones se hará uso del cluster de Cronos de la Universidad EAFIT, el cual cuenta con 35 nodos y 16 núcleos por nodo. También se hará uso de programas gratuitos como LigParGen del profesor William L. Jorgensen para obtener los parámetros del campo de fuerza OPLS, Packmol desarrollado por el Instituto de Química y Matemáticas de la Universidad de Campinas para generar configuraciones iniciales del sistema y el programa Moltemplate desarrollado por el profesor Andrew Jewett que permite obtener los archivos para correr LAMMPS. Además, para subrutinas dentro del proceso, se desarrollaron programas en Fortran como EAFIT.dm y PolimeroCasting escritos por el profesor Cesar Augusto Pérez y en Python como AgregadoCentrado por la estudiante Ana María Muñoz.

6.1.1 Definición de variables

Se propone un banco compuesto por cuatro monómeros de diferentes funcionalidades (vinílicos o acrílicos) y otro banco compuesto por cuatro solventes de diferente polaridad y una única plantilla, Rodamina B. (Figura 11)

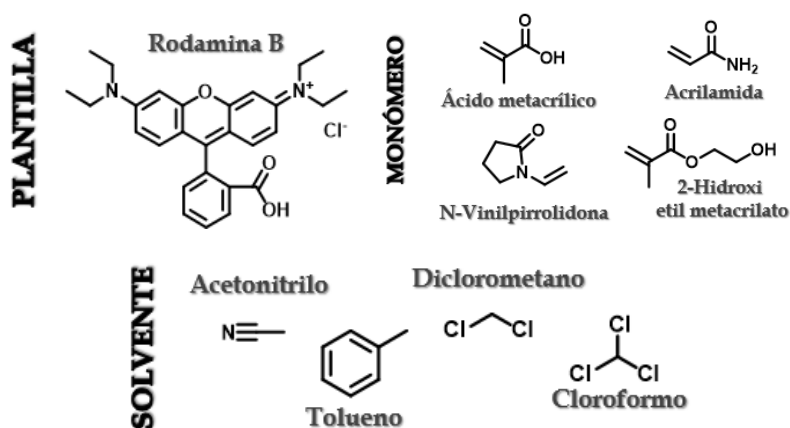


Figura 11. Definición de variables para dinámica molecular

Se realizarán todas las combinaciones posibles, es decir, para cada sistema de monómero diferente, se harán cuatro nuevos sistemas con los diferentes solventes, para un total de 16 experimentos, cada uno con tres replicas.

6.1.2 Modelación de parámetros iniciales

Se construirá el sistema inicial de monómero + plantilla + solvente utilizando como se mencionó anteriormente los programas LigParGen (posiciones atómicas, conectividad, y coeficientes de campo de fuerza), EAFIT.dm (construye archivos formato), Packmol (construye archivo de las posiciones de todo el sistema) y Moltemplate (construye archivos de ejecución de LAMMPS).

6.1.3 Simulación LAMMPS

Una vez obtenidos los archivos de entrada, se procede a hacer la minimización del sistema y seguidamente la producción. En la minimización se utilizan los archivos de ejecución en LAMMPS de Moltemplate y en la producción se utiliza el archivo de salida de minimización y de Moltemplate.

Así obtendremos la configuración del sistema en el equilibrio, es decir, 1 atmosfera de presión, 298 K y número de moléculas (N) constante.

6.1.4 Análisis estructural

De cada experimento final se analizarán los archivos de salida con el programa PolimeroCasting, programa escrito en Fortran para hacer la extracción y el conteo de cuantas moléculas de monómero y solvente quedaron ubicadas alrededor de la plantilla a una distancia fija de 5 Angstrom de la molécula plantilla. (Figura 12)

Seguidamente el sistema resultante se ingresa al programa AgregadoCentrado escrito en Python para desplazar todos los componentes del sistema a una nueva caja de simulación, esto se realiza con la idea de estandarizar de alguna manera las posiciones de todos los experimentos, ya que no todos se movieron la misma distancia en la simulación inicial. Posteriormente se pueden analizar los tipos de interacciones (enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones dipolo-dipolo o interacciones de Van der Waals) para determinar la presencia de sitios de reconocimiento específicos.

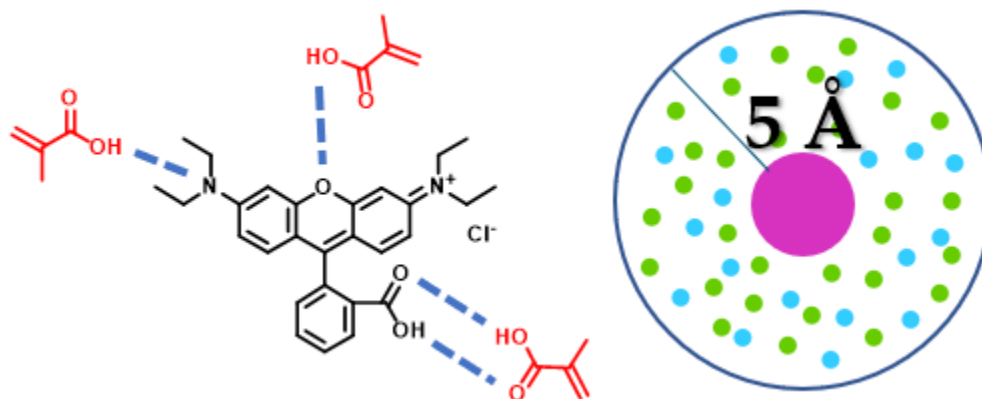


Figura 12. Análisis poblacional después de las simulaciones

Los monómeros y solventes que presenten mayor afinidad por la plantilla serán aquellos que presenten mayor número de moléculas alrededor de la plantilla, y son los que se seleccionaran para la síntesis del polímero.

6.2 Optimización de la síntesis

Con el objeto de familiarizarse con las técnicas de polimerización disponibles para MIPs y optimizar los diferentes parámetros experimentales de la síntesis, se van a modificar las siguientes variables:

- Tamaño del reactor
- Polimerización térmica o con luz Ultravioleta
- Agitación mecánica o magnética
- Tiempo de formación del pre-polímero
- Volumen y tiempo de reacción
- Composición y Proporción de reactivos

Para todas las reacciones de optimización, se emplearon los reactivos que se muestran en Figura 13 y se fueron modificando una por una las variables anteriormente mencionadas, como se observa en la Figura 14.

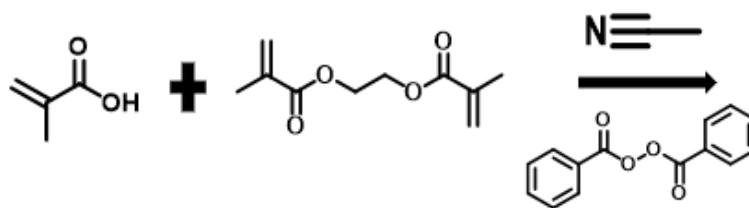


Figura 13. Reactivos empleados para la optimización de la síntesis

1	2	3	4	5	6	7
Volumen de solvente	Proporción Mon:Entr	Iniciador	Solventes/ Mezclas		Tiempo de reacción	Monómero
200 mL 100 mL 40 mL 20 mL	17:100 1:1 1:5	ABCN	TOL	TOL/ ACN	5 h 2 h 1 h	N-VP

Figura 14. Modificación de variables para la optimización

6.3 Síntesis de MIPs y NIPs

Las partículas de polímeros con impresión molecular (MIP) y sin impresión (NIP) se sintetizan mediante polimerización en solución con los reactivos que se muestran a continuación en la Figura 15.

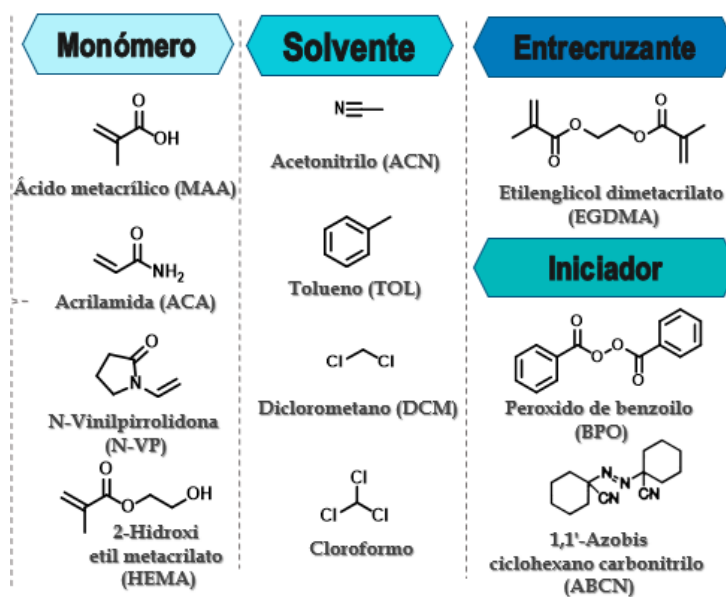


Figura 15. Reactivos de síntesis

La polimerización se llevó a cabo en un reactor de polimerización de 20 mL, con un agitador mecánico, un baño de aceite, condensador y línea de nitrógeno como se observa en la Figura 16.

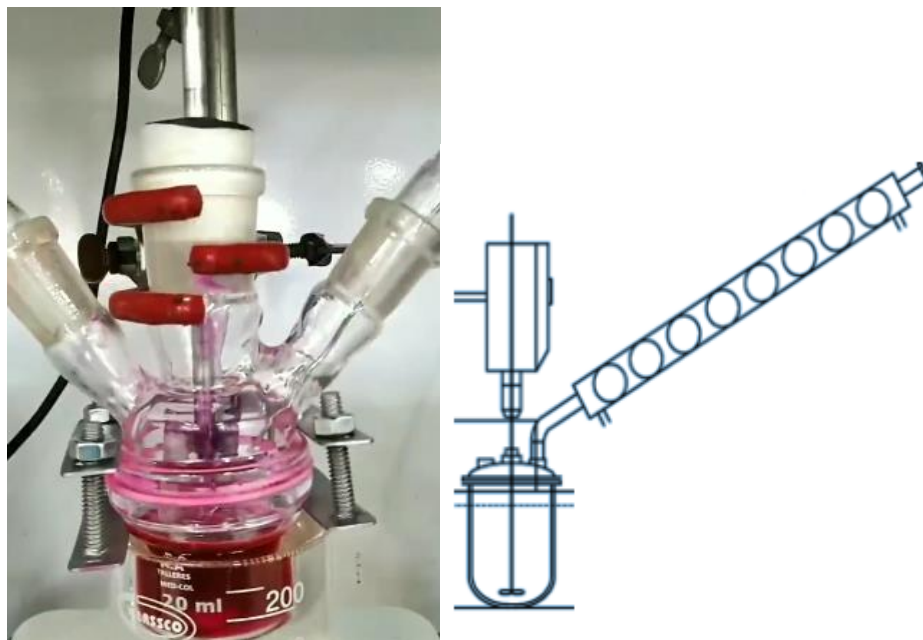


Figura 16. Reactor de polimerización

Inicialmente se mezcla la Rodamina B (0,05 g) con el monómero (2 mmol) en 30% del volumen de solvente final (6 mL); esta mezcla se deja durante toda la noche formando el complejo de pre-polimerización.

Al día siguiente se disuelve el entrecruzante (10 mmol) en el solvente restante (10 mL) para la preparación de la fase continua. Una vez se añade el medio continuo y el complejo de pre-polimerización en el reactor, se purga el sistema con nitrógeno gaseoso durante 15 minutos y posteriormente se agrega la solución (4 mL) del iniciador (0,1 g) en el reactor con agitación (100 rpm) a 80-90 °C. La polimerización transcurrirá durante 2 h.

Los polímeros control NIP (sin RhB como plantilla) se sintetizaron en las mismas condiciones.

En la Figura 17 se puede observar de manera gráfica el proceso de síntesis general para los MIP y los NIP

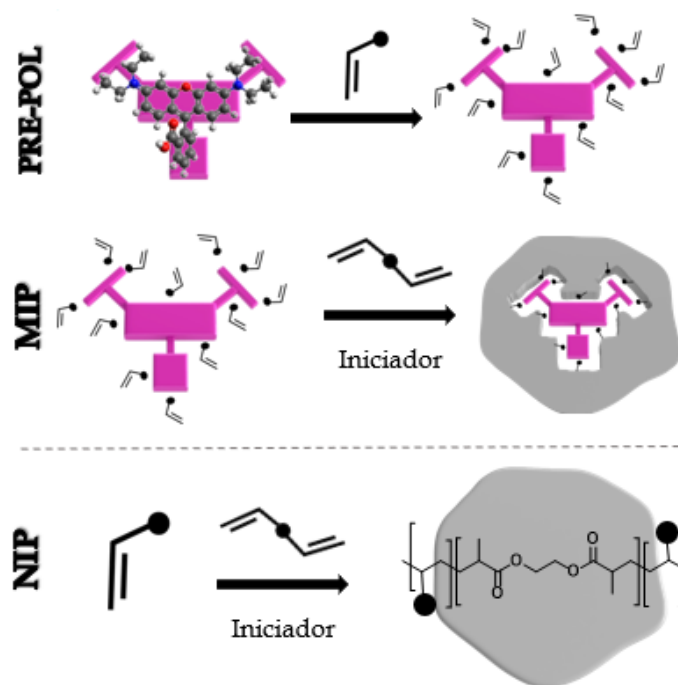


Figura 17. Esquema gráfico del proceso de síntesis

6.4 Purificación

Los polímeros resultantes (MIPs y NIPs) se lavaron por diferentes métodos y con variados solventes para eliminar la plantilla hasta que no se pudiera detectar la RhB (Figura 18) y luego se enjuagaron repetidamente con agua para su posterior secado en el horno a 60°C.

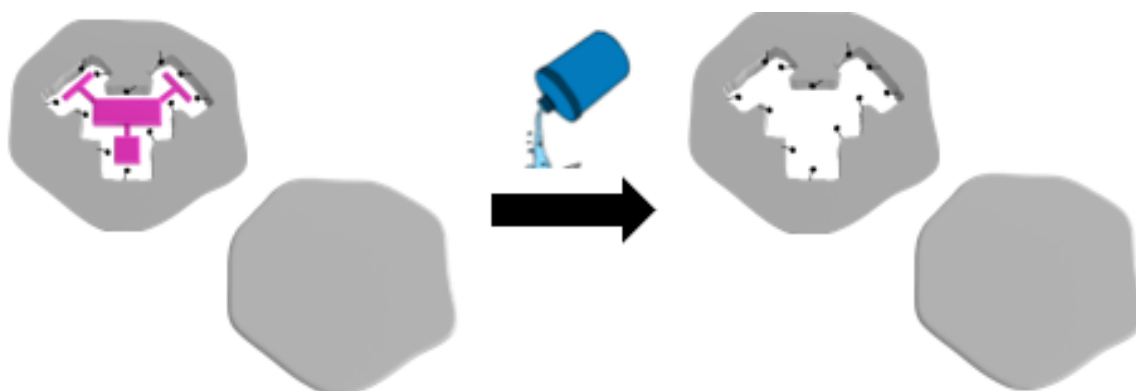


Figura 18. Lavados para eliminar la plantilla

A continuación se describen los métodos empleados para purificar los polímeros obtenidos, para determinar cuál de ellos es el más eficiente:

6.4.1 Agitación-Centrifugación decantación

Después de la síntesis del polímero, estos se lavan con acetonitrilo inicialmente para retirar el exceso de plantilla durante la reacción, seguidos de una solución ácido acético-metanol al 10% y por último etanol. Las soluciones se agitan mecánicamente durante varios minutos y luego las partículas son precipitadas por centrifugación. La absorbancia UV-vis de la RhB se mide en el sobrenadante que se decanta cada vez hasta la RhB no sea detectada

6.4.2 Filtración al vacío

Se empleó el sistema de filtración al vacío tradicional. Mientras el polímero queda retenido en el filtro, los diferentes solventes (acetonitrilo, ácido acético-metanol, etanol y agua) pasan a través de este hasta que la plantilla sea indetectable en el polímero por UV-vis. (ver Figura 19)



Figura 19. Filtración al vacío para purificación

6.4.3 Soxhlet

Con un montaje soxhlet (Figura 20), se someten los polímeros a un proceso de extracción de la plantilla con los diferentes solventes a una temperatura de 50°C por aproximadamente 12 horas. Este sistema permite reutilizar la misma cantidad de solvente durante toda la extracción.



Figura 20. Sistema soxhlet para purificación

6.5 Caracterización

Para caracterizar los polímeros obtenidos se emplearan las siguientes técnicas:

6.5.1 Espectroscopía Infraroja (FTIR)

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de las muestras diluidos en KBr para preparar pastillas, fueron obtenidas por reflectancia total atenuada en un espectrómetro Shimadzu modelo IR Tracer. Cada espectro se normalizó con fines de comparación. Para cada muestra se hicieron 16 barridos a una resolución de 4 cm^{-1} .

6.5.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las muestras se determinó por medio de un microscopio electrónico de barrido termoiónico.

6.5.3 Dispersión de luz dinámica (DLS)

El análisis de tamaño de partícula se realizó en un equipo ZetasizerPro. Las suspensiones fueron formadas con aproximadamente 0,01g del polímero y 10 mL de agua.

6.5.4 Análisis termogravimétrico

Los análisis termogravimétricos se llevaron a cabo en un equipo TGA Q500 de TA Instruments, calentando la muestra desde 25°C a 800°C, con una rampa de calentamiento de 20 °C/min usando una atmósfera $\text{N}_2:\text{O}_2$ 80%:20%.

6.6 Recaptación

La capacidad de adsorción y reconocimiento del MIP fueron estudiadas por Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-vis).

Las pruebas de recaptación se llevarán a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo: 50 mg de polímero seco se introducen en un falcón con 5 mL de solución de la plantilla a una concentración inicial 30 μM . Los tubos se sellan y se agitan a 50°C y 80 rpm durante 30 minutos. Después del período de incubación, a intervalos de tiempo específicos, los polímeros se centrifugan a 2500 rpm y se extraerán muestras del sobrenadante. La concentración de plantilla en el sobrenadante se mide con un espectrómetro UV, y posteriormente se puede determinar la cantidad de molécula objetivo-adsorbida. La eficiencia de impresión se calculó a partir de la relación de la actividad de unión del polímero impreso con respecto a la del no impreso. El esquema gráfico del procedimiento anterior se observa en la Figura 21.

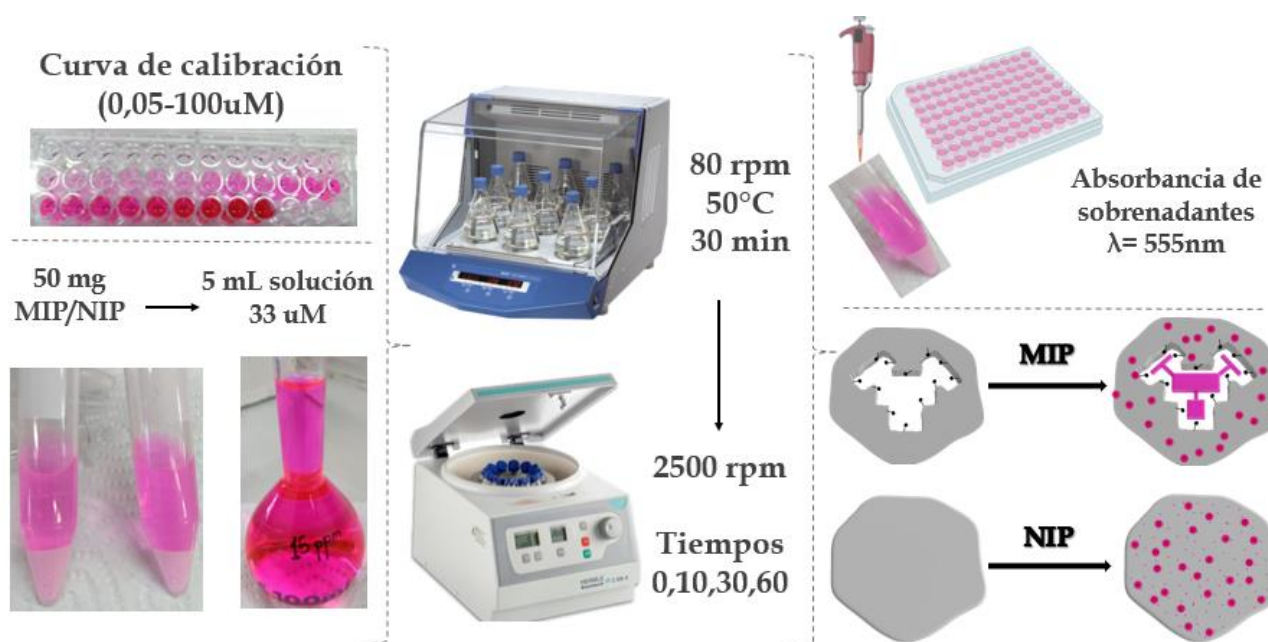


Figura 21. Esquema gráfico de la prueba de recaptación

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Dinámica molecular

En la Figura 22, se observa un gráfico con los resultados dinámico-computacionales para las 16 combinaciones posibles entre los monómeros y solventes disponibles para la simulación. El número de moléculas de monómero a una distancia de 5 Å de la Rodamina B se puede relacionar directamente con la probabilidad de que se forme una cavidad de reconocimiento debido a que aumentan las posibilidades de interacción. Así, los sistemas que presenten mayor número de moléculas alrededor de la plantilla son los sistemas que serán seleccionados para corroborar su eficiencia experimental.

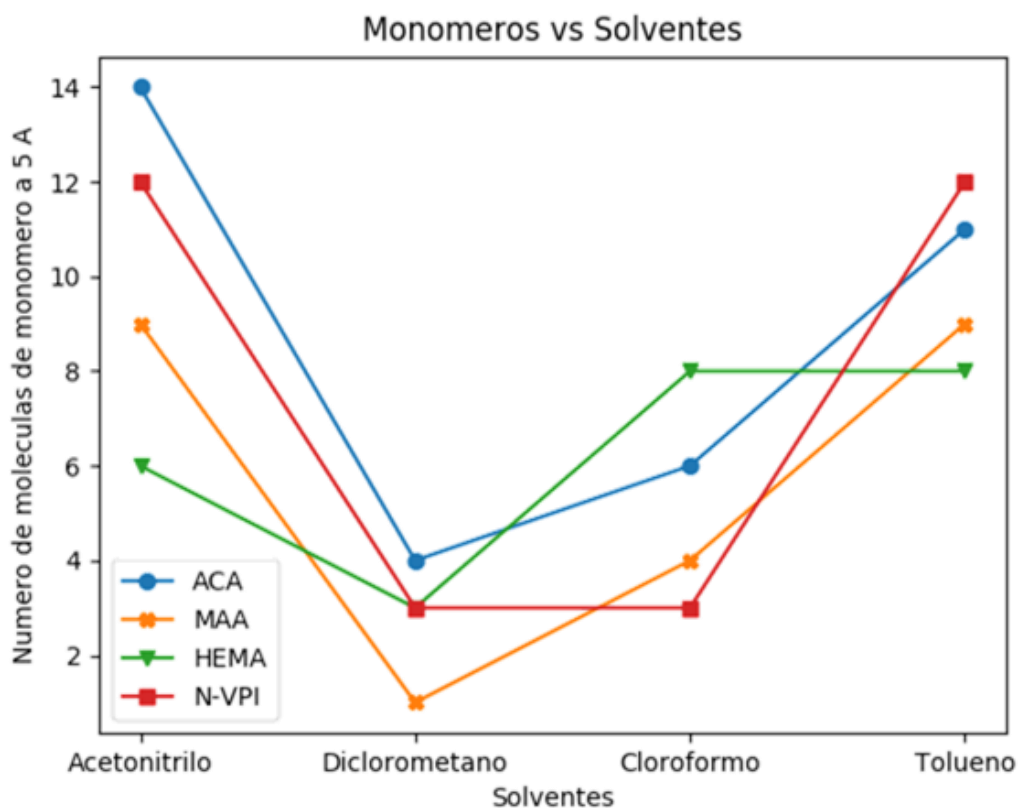


Figura 22. Moléculas de monómero y solvente alrededor de la RhB

Inicialmente se descartan todos los sistemas con diclorometano y cloroformo, debido a que estos no permiten la polimerización a las condiciones optimizadas y además de que son los sistemas donde menor número de moléculas de monómero hay en todos los casos.

Por lo tanto, se seleccionan tolueno y acetonitrilo como solventes con MAA y N-VP ya que presentan los mejores resultados y al mismo tiempo presentan una diferencia considerable para poder ser comparados cuando se corrobore experimentalmente.

En la Figura 23 se puede ver después de la simulación las moléculas de monómero y solvente alrededor de la RhB (amarilla), la cual al ser retirada deja una cavidad complementaria en forma y tamaño con la plantilla, que se espera de lugar a la recaptación.

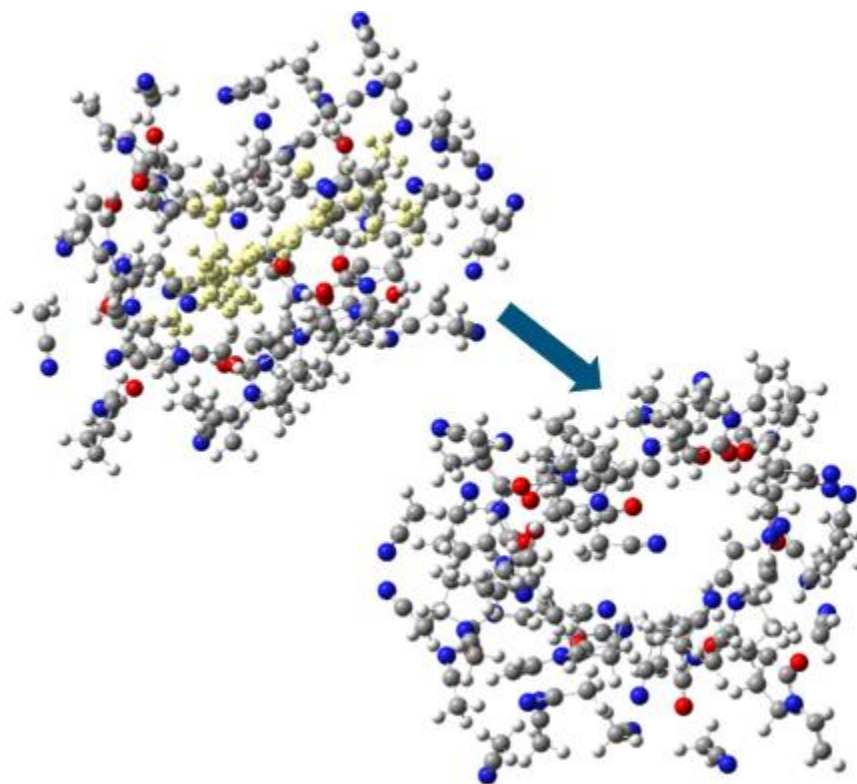


Figura 23. Cavidad de RhB

7.2 Optimización de la síntesis

Se llevaron a cabo diferentes grupos de síntesis utilizando los mismos reactivos en cada una como ya se mencionó en la sección 6.2, donde se modificaban las diferentes variables presentadas en la Figura 24.

1	2	3	4	5	6	7
Volumen de solvente	Proporción Mon:Entr	Iniciador	Solventes/ Mezclas		Tiempo de reacción	Monómero
200 mL 100 mL 40 mL 20 mL	17:100 1:1 1:5	ABCN	TOL	TOL/ ACN	5 h 2 h 1 h	N-VP
BAJOS RENDIMIENTOS (2-5%)		RENDIMIENTOS ALTOS (60-85%)				

Figura 24. Resultados de la optimización de la síntesis

Inicialmente se modificaron los volúmenes de solvente y la proporción entre monómero y entrecruzante, pero se obtienen rendimientos de reacción muy bajos (entre el 2 y el 5%)

Por lo anterior se decidió cambiar el tipo de iniciador, seguido de los tipos de solvente mejorando significativamente los rendimientos (60%)

Finalmente se modificaron los tiempos de reacción y se verificó la posibilidad de polimerización con otro monómero.

Así se logró determinar que las condiciones óptimas de reacción son las presentadas en la Figura 25.

CONDICIONES	OPTIMIZADAS
Relación Monómero: Entrecruzante	1:5
Contenido de sólidos	10-15%
Temperatura	80-90 °C
rpm	50
Concentración plantilla	5 mM
Volumen reacción	20 mL
Tiempo reacción	2 horas
Rendimiento	60-85%

Figura 25. Condiciones óptimas de reacción

Entre las variables más significativas que se lograron optimizar están el volumen, tiempo y rendimiento de reacción. Se logró pasar de 200 a 20 mL de volumen, de 8 a 2 horas de reacción y rendimientos del 2% a rendimientos del 85%.

7.3 Síntesis de MIP

Teniendo en cuenta los monómeros y solventes seleccionados a partir de las simulaciones dinámico-computacionales y las condiciones de reacción optimizadas, se sintetizarán los 4 tipos de MIP resultantes (ver Figura 26) con sus respectivos NIP, para un total de 8 polímeros.

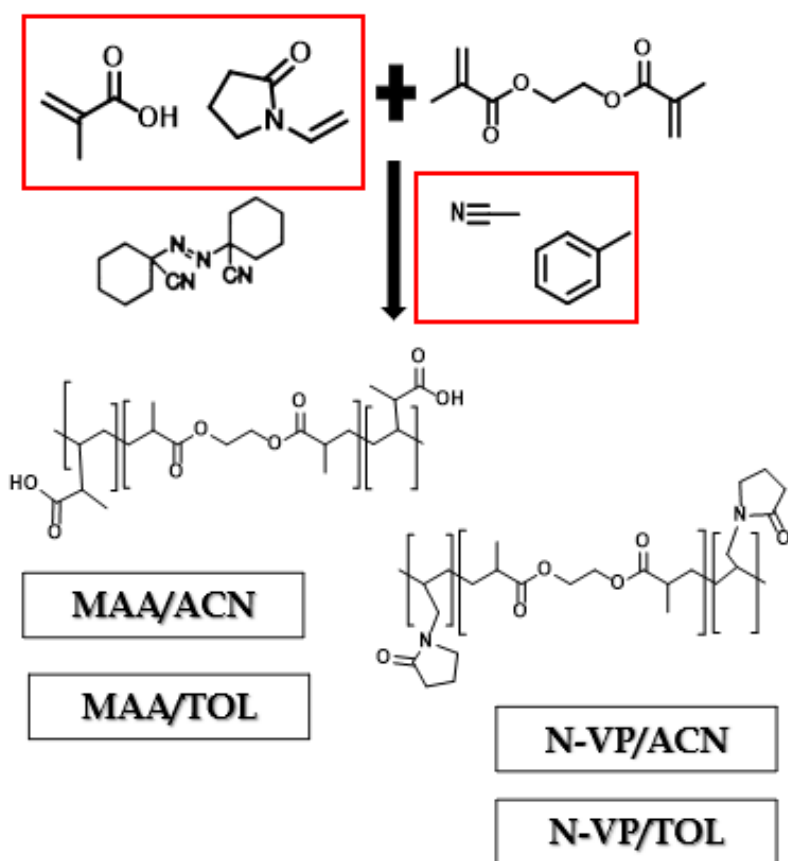


Figura 26. Síntesis de los cuatro grupos de polímeros

7.4 Purificación

Después de la síntesis, se eligió el Soxhlet como mejor sistema de purificación ya que permite reutilizar el solvente, es más práctico y además es el más eficiente en la extracción de la

plantilla del polímero, lo que puede deberse a la ayuda energética extra con la que cuenta al emplear temperatura como parte de la extracción.

Sin embargo, si comparamos los NIP (blancos) con los MIP (ver Figura 27) se puede observar que la RhB no se elimina completamente. Esto puede deberse a que las interacciones monómero-plantilla son tan fuertes que se requiere más energía para romperlas.













	MIP		NIP
	ANTES	PURIFICADO	
MAA/ACN			
MAA/TOL			
N-VP/ACN			
N-VP/TOL			

Figura 27. Purificación de los polímeros

Incluso se puede ver que el polímero compuesto por N-VP y TOL es con el que menos eficiencia de purificación se logra, y este corresponde a las interacciones más fuertes predichas computacionales, corroborando la hipótesis de la fuerza de las interacciones, es decir, que no siempre los monómeros que presenten las interacciones más fuertes con la plantilla son los mejores para sintetizar los MIP debido a la dificultad que presentan al

momento de la purificación. Si las cavidades siguen “ocupadas” por falencias en la purificación, la recaptación se verá directamente afectada.

7.5 Caracterización

7.5.1 Análisis estructural

En las Figura 28 y Figura 29 se muestra el espectro FTIR de los grupos de polímeros sintetizados, cuyas estructuras se muestran previamente en la Figura 26.

En estos espectros podemos ver que los diferentes grupos de polímeros tienen la misma estructura ya que todas sus señales se solapan, lo que era de esperarse, pues su composición química es equivalente.

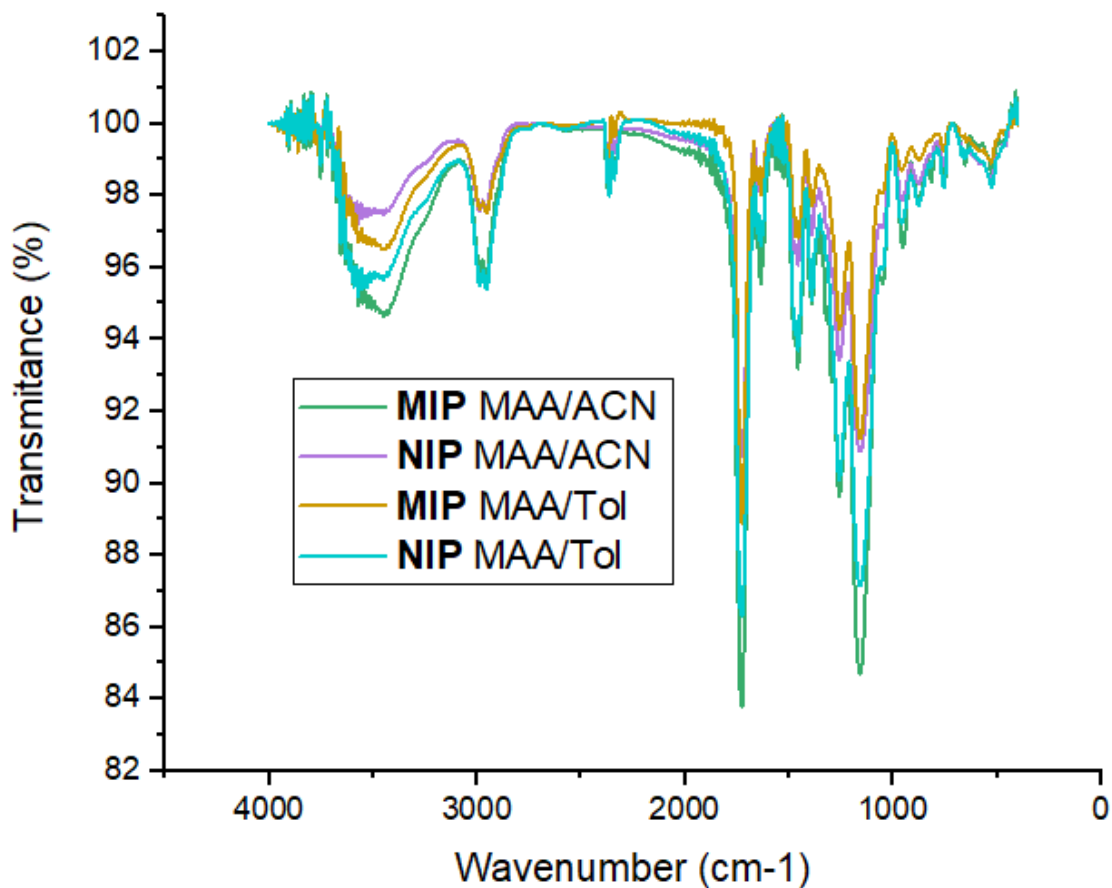


Figura 28. Espectro Infrarrojo de los polímeros sintetizados a partir de MAA

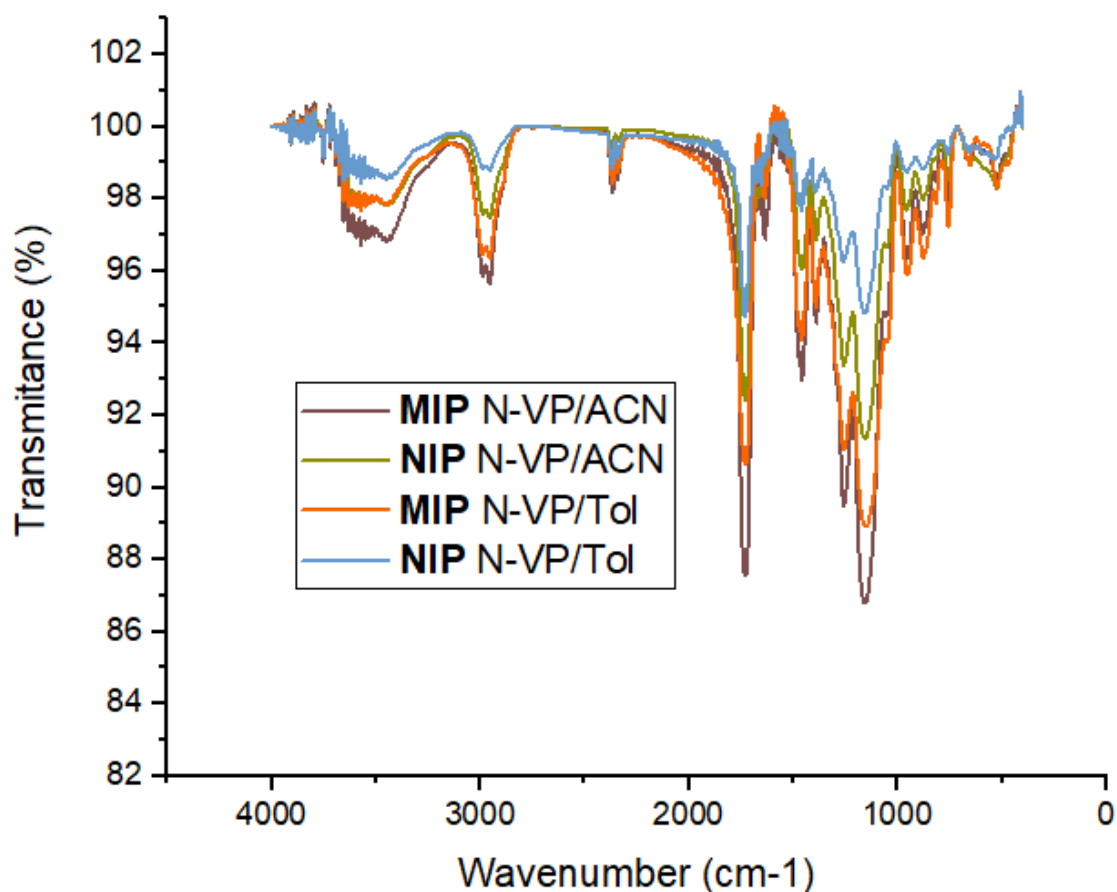


Figura 29. Espectro Infrarrojo de los polímeros sintetizados a partir de N-VP

Al comparar con los materiales de partida (ver Figura 30) podemos verificar que la polimerización fue exitosa debido a que desaparecen las señales correspondientes a la tensión de los dobles enlaces alrededor de 1676 cm^{-1} y las flexiones CH fuera del plano alrededor de 800 cm^{-1} .

Además, se conservan las bandas correspondientes a la extensión del carbonilo alrededor de 1733 cm^{-1} , las extensiones C-H alrededor de 2958 cm^{-1} , las extensiones O-H de los grupos hidroxilo alrededor de 3000 cm^{-1} y las extensiones C-O de 1258 a 1165 cm^{-1} .

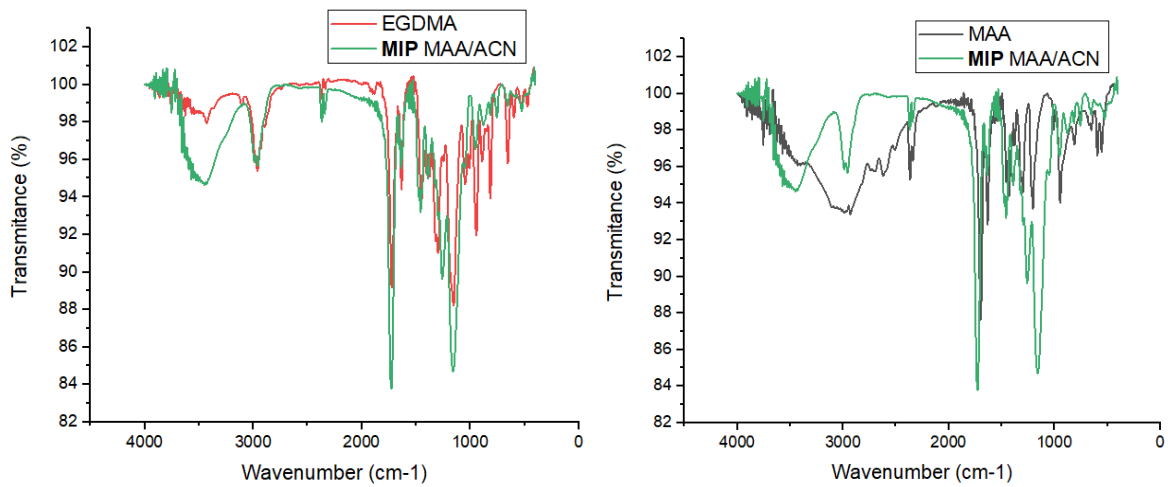


Figura 30. Espectro infrarojo del polímero comparado con los materiales de partida

7.5.2 Morfología

La caracterización morfológica presentada en la Figura 31 nos muestra que, en general, tanto los MIP como los NIP forman aglomerados de partículas esféricas exceptuando el polímero N-VP/TOL, mismo polímero con el que se presentó inconvenientes en la purificación.

Esta geometría esférica permite aumentar el área superficial de los polímeros, incrementando la posibilidad de interacción con la plantilla para dar lugar a la recaptación

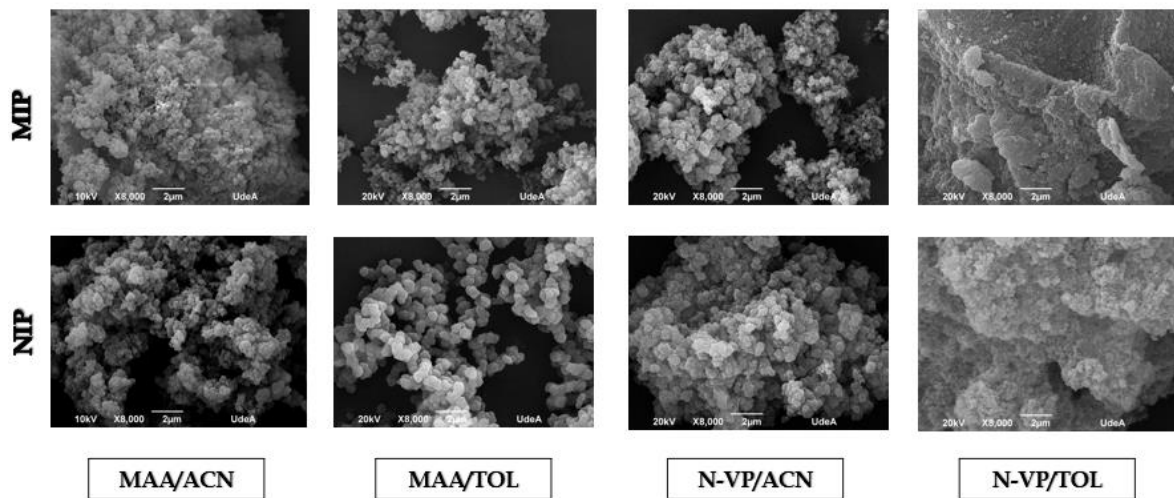


Figura 31. Microesferas de los 4 grupos de polímeros

7.5.3 Tamaño de partícula

Los tamaños de partícula fueron corroborados por SEM y por DLS, y para todos los polímeros son relativamente similares como se presenta en la Tabla 2. Promedio de tamaños de partícula MIP y NIP Las partículas más pequeñas más pequeñas fueron de 100 nm y estas iban formando aglomerados de partículas de 300, 500 y hasta 1000 nm.

Tabla 2. Promedio de tamaños de partícula MIP y NIP

	Tamaño promedio MIP (nm)	Tamaño promedio NIP (nm)
MAA/ACN	732	1010
MAA/TOL	813	954
N-VP/ACN	736	922
N-VP/TOL	305	200

7.5.4 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico de la Figura 32 muestra la pérdida de peso en función de la temperatura, se observa una primera y única pérdida de peso pronunciada alrededor de los 350°C. La estabilidad térmica posiblemente se debe a una buena estructuración de los dominios rígidos del polímero lo cual nos da un tiempo de vida útil más prolongado de este tipo de plataformas.

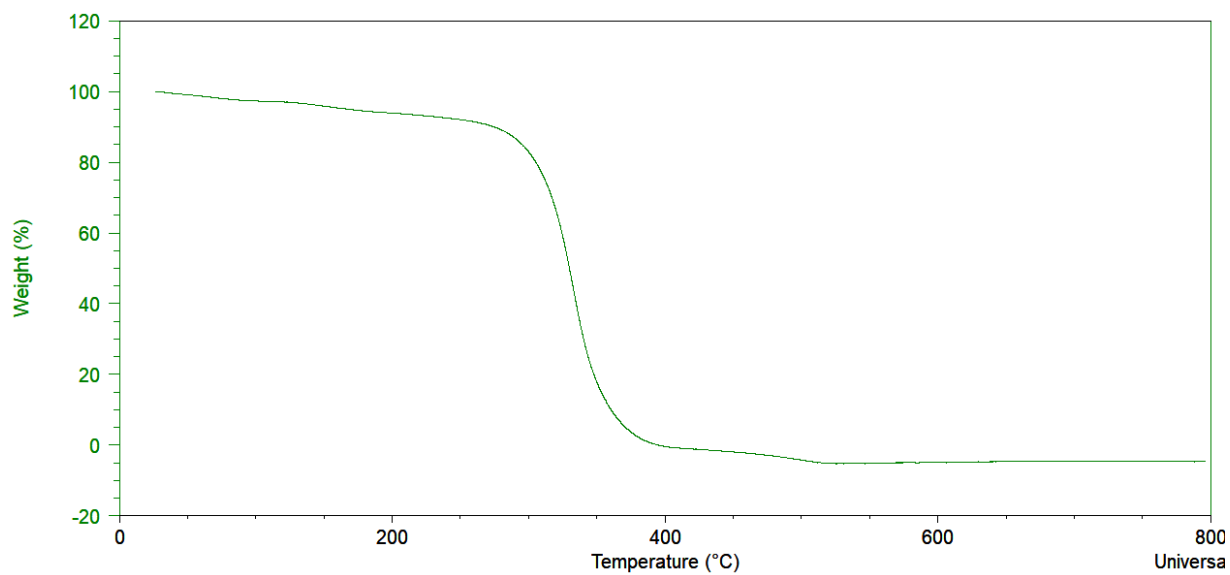


Figura 32. Análisis termogravimétrico (pérdida de peso vs temperatura)

7.6 Recaptación

Finalmente, para poder comparar el desempeño de los polímeros sintetizados se realizan las pruebas de captación de RhB.

Inicialmente, se construye la curva de calibración (Figura 33) para poder determinar los rangos de concentración de RhB captados por cada uno de los polímeros

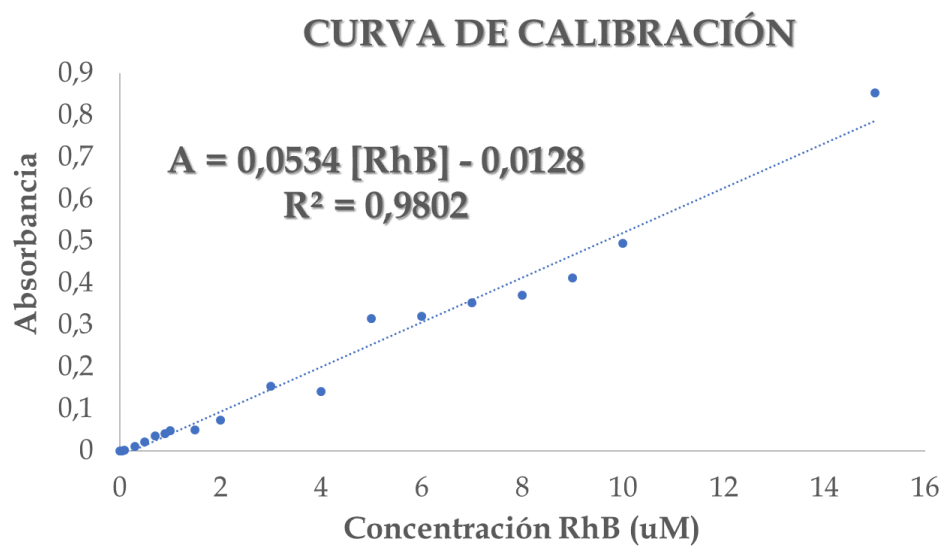


Figura 33. Curva de Calibración RhB

Para obtener el valor de recaptación, se emplea la siguiente fórmula:

$$R(\mu M/mg) = \frac{(C_i - C_s)}{m}$$

Donde,

R es el valor de recaptación

C_i es la concentración inicial de la solución de RhB empleada

C_s es la concentración de RhB en el sobrenadante

m es la masa de polímero empleada

Este cálculo se realiza tanto para el MIP como para el NIP. Si restamos estos dos valores y obtenemos un valor positivo quiere decir que la recaptación fue exitosa y está dada en unidades de concentración*miligramos de polímero. Estos valores son presentados en la Figura 34 y podemos ver que todos los polímeros presentan una recaptación exitosa (barras positivas), exceptuando el polímero N-VP/TOL, el mismo polímero que mostró problemas durante la purificación y presenta una morfología más amorfa.

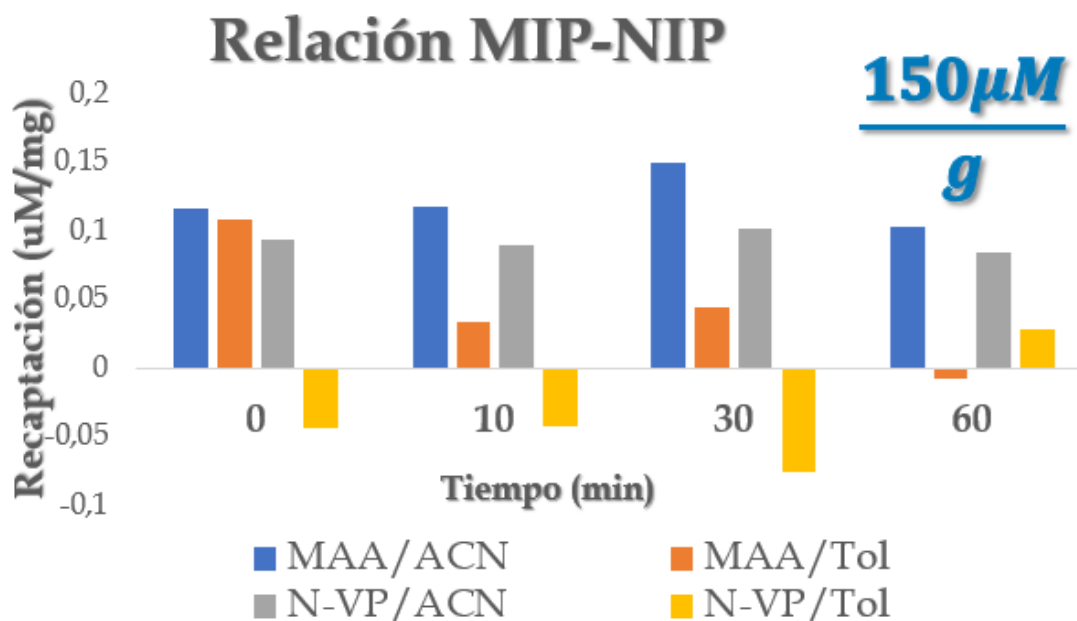


Figura 34. Resultados de Recaptación

Adicionalmente, se observa que 30 minutos después del equilibrio se da el valor máximo de recaptación posible después de ahí es posible que se esté llegando a un equilibrio que genere una disminución en la recaptación.

Si tomamos el valor más alto que se logró en términos de recaptación, en este caso el polímero MAA/ACN, y la relación fuese proporcional tenemos que 1g de polímero equivaldría a una recaptación de 150 μM .

8 CONCLUSIONES

-Los resultados computacionales se correlacionan con los resultados experimentales, comprobando así que la mejor combinación para un MIP de Rodamina B es a partir de ácido meta acrílico y acetonitrilo ya que son los que presentan mejor desempeño en la recaptación.

-Se optimizaron las condiciones de síntesis, purificación y recaptación. Con un tiempo de reacción de 2 horas entre 80 y 90°C, una concentración de plantilla 5mM, relación monómero: entrecruzante 1:5 y un volumen de reacción de 20mL con aproximadamente 10% de contenido de sólidos.

-La recaptación máxima de todos los MIP sintetizados se alcanza 30 minutos después del equilibrio.

-El MIP compuesto por N-Vinil Pirrolidona y tolueno, es el único que presenta menor desempeño que el NIP, los demás presentan mayor recaptación. Esto debido a que con este monómero se presentan las interacciones más fuertes con la plantilla impidiendo que las cavidades estén libres para la recaptación. Además, es el único polímero que no presenta una geometría esférica, lo que se traduce a una menor área de contacto con la solución de RhB

-Los polímeros sintetizados con acetonitrilo como solvente presentan mejor recaptación que los sintetizados con tolueno.

-Los MIP con geometría más esférica y tamaño micrométrico presentan mayor recaptación de RhB en solución que los demás con respecto a los NIP.

-Los MIP y los NIP presentan una buena resistencia a temperaturas elevadas, tienen un punto de descomposición alrededor de los 300°C.

Las conclusiones anteriores se resumen gráficamente en la Figura 35

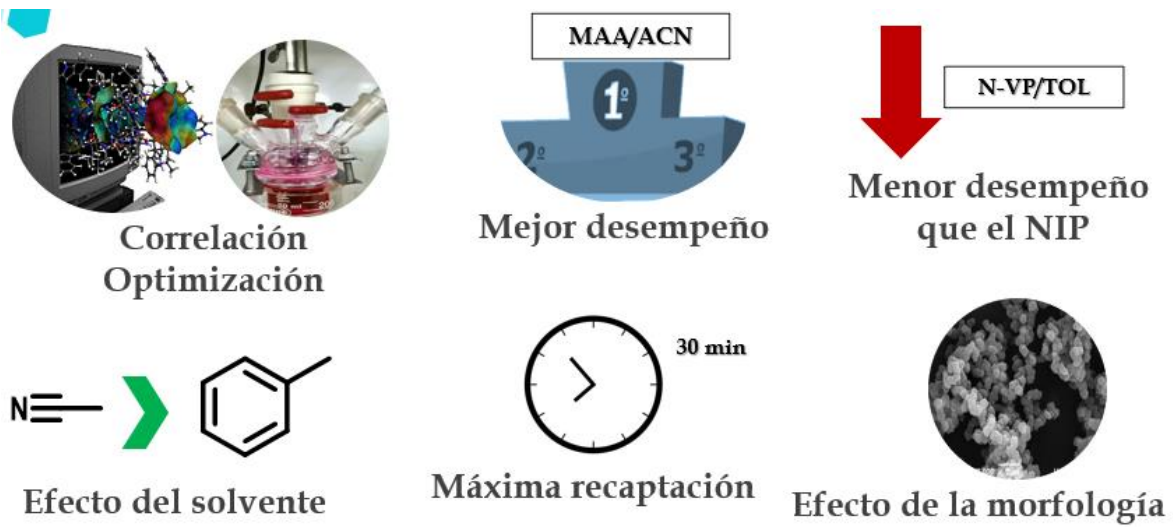


Figura 35. Conclusiones gráficas

9 PERSPECTIVAS

- Caracterizar por TEM para mejorar la resolución de las imágenes de los polímeros.
- Evaluar la recaptación con DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES de Rodamina B.
- Sintetizar los MIP empleando MEZCLAS DE MONÓMEROS.
- Evaluar la SELECTIVIDAD de los MIP hacia RhB utilizando soluciones de diferentes moléculas prueba.
- Diseñar el MIP con INTERLEUCINA 4 como plantilla, para su potencial aplicación como biosensor del cáncer colorrectal, y acoplarlo a una plataforma transductora para el desarrollo de un sensor.

ANEXO. APORTES DEL PROYECTO

Como parte del proceso formativo, se participó en una pasantía de Investigación “Research Experience for Undergraduates (REU) Program” en la Universidad de Akron, OHIO. (Figura 36)

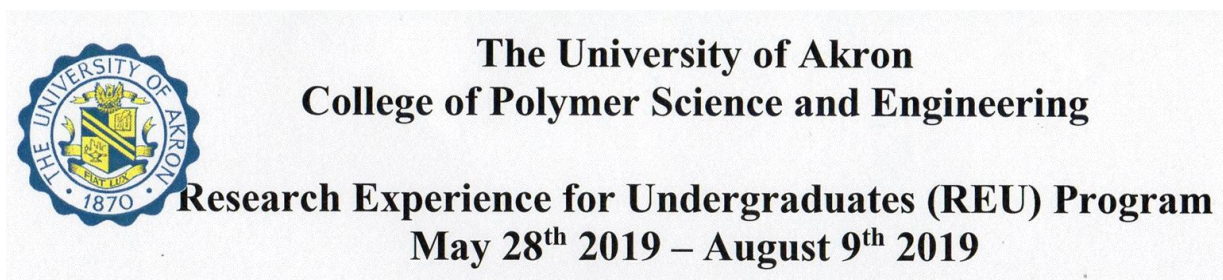


Figura 36. Pasantía de Investigación

Los resultados del proyecto de investigación de la pasantía “Synthesis and characterization of coacervate forming thermoresponsive polyesters for doxorubicin delivery”, fueron presentados en el “Northeast Ohio Undergraduate Research Symposium (NOURS)” (Figura 37) en modalidad de póster (Figura 38).



Figura 37. Simposio de Investigación

Synthesis and characterization of coacervate forming thermoresponsive polyesters for doxorubicin delivery

Yuliana Ospina,¹ Mangaldeep Kundu², Abraham Joy²

¹Laboratorio de Investigación en Polímeros, Universidad de Antioquia, Colombia

²Department of Polymer Science, The University of Akron

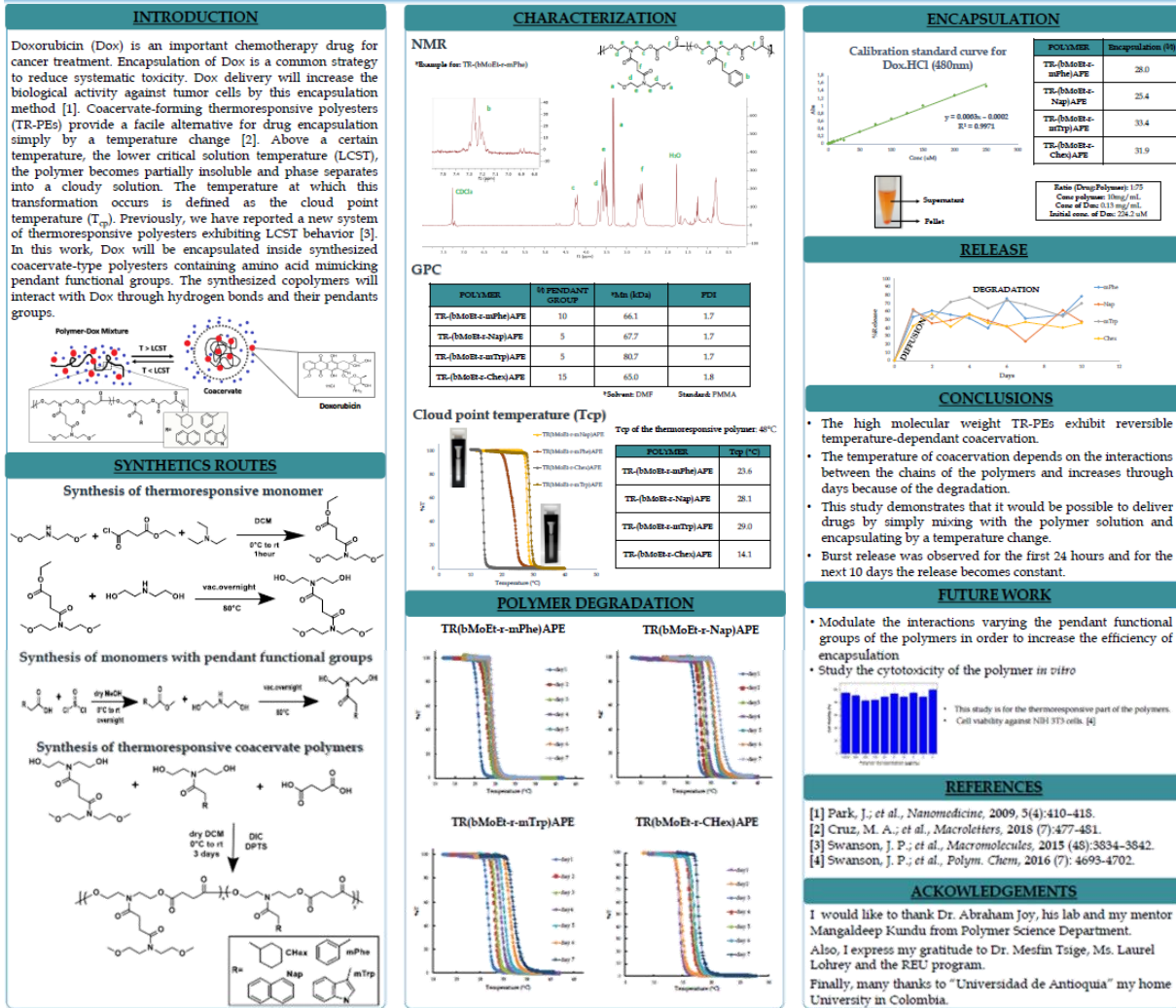


Figura 38. Póster: pasantía de investigación

REFERENCIAS

- (MINSALuD, M. s. (18 de Octubre de 2018). *Sensibilízate con el cáncer de colón*. Obtenido de [https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PENT/Paginas/Prevencion del-cancer.aspx](https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PENT/Paginas/Prevencion%20del-cancer.aspx)
- (WHO), W. H. (s.f.). *Cancer*. Recuperado el 10 de Octubre de 2018, de <http://www.who.int/cancer/prevention/en/>
- A. Bossi, F. B. (2007). Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art. (22).
- A.G. Mayes, M. J. (2005). Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. 57(1742-1778).
- A.G. Mayes, M. W. (2005). Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. (57).
- Abbas. A, L. P. (2008). Mecanismos efectores de las respuestas inmunitarias: Citocinas. (6).
- Avendano, C., & Menéndez, J. (2008). *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*.
cáncer, I. n. (s.f.). *Diccionario del cáncer*. Recuperado el 13 de Noviembre de 2018, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/interleucina>
- Canfarotta, F. (2018). A novel capacitive sensor based on molecularly imprinted nanoparticles as recognition elements. 120(30).
- Cecilia Rossetti, e. (2014). Antibody-Free Biomarker Determination: Exploring Molecularly Imprinted Polymers for Pro-Gastrin Releasing Peptide . (86).
- Chih-Hsien Hu, T.-C. C. (2008). Albumin molecularly imprinted polymer with high template affinity- Prepared by systematic optimization in mixed organic/aqueous media. (91).
- Daniel M. Hawkins, D. S. (2005). Investigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs). 542(1).
- David R.Kryscio, N. A. (2012). Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. 8(2).
- et.al, G. V. (2011). Molecularly imprinted polymer: Present and future prospectives. 12(9).

- Gizem Erturk., B. M. (2016). Molecular imprinting techniques used for the preparation of biosensors. *17*(288).
- Guide, N. H. (s.f.). *What's the function of the large intestine?* Recuperado el 6 de Noviembre de 2018, de <http://www.newhealthguide.org7Function-Of-Large-Intestine.html>
- Guoqi Fu, e. (2007). Bovine serum albumin-imprinted polymer gels prepared by graft copolymerization of acrylamide on chitosan. (67).
- Jordan, C., Guzman, M., & Noble, M. (2006). *Cancer Stem Cells*. 1.
- Kraich M, K. M. (2006). A modular interface of IL-4 allows for scalable affinity without specificity for the IL-4 receptor.
- Li, Z., Jiang, J., Wang, Z., Zhang, J., Xiao, M., Wang, C., . . . Qin, Z. (2008). Endogenous Interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *68*(21).
- Lingxin Chen, X. W. (2016). *Molecular imprinting: Perspectives and applications*.
- Marcin Dabrowski, e. (2018). Nanostructured molecularly imprinted polymers for protein chemosensing. *102*(17-26).
- Mariana Roberto Gama, C. B. (2017). *Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation*. (1043).
- Mishra, J., Drummond, J., Quazi, S., Karanki, S. S., & Shaw, J. J. (2013). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *3*(86).
- Nicole M. Bergmann, N. A. (2008). *Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins*. *33*(3).
- Nostrum, E. V.-A. (2011). *Challenges for the effective molecular imprinting of proteins*. (32).
- Piletska, K. S.-K. (2017). *New potentiometric sensor based on molecularly imprinted nanoparticles for cocaine detection*. (96).
- Ribeiro, A. (s.f.). *Diagrama del colon*. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de http://bancadirecta.blogspot.com.co/2009/05/o-saber-nao-ocupa-lugar-temas-de_18.html
- S.H Ou, M. W. (2004). Polyacrilamide gels with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of lysozyme. *504*(1).
- Schirhagl, R. (2013). *Bioapplications for molecularly imprinted polymers*. *1*(86).

- Schmitz J, O. A. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. (23).
- Society, A. C. (s.f.). *About Colorectal Cancer*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2018, de <http://www.cancer.org/cancer/colon-rectal.html>
- Society, A. C. (s.f.). *Detección temprana, diagnóstico y clasificación por etapas*. Recuperado el 20 de Octubre de 2018, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/como-se-diagnostica.html>
- Songjun Li, S. C. (2014). Size matters: Challenges in imprinting macromolecules. 33(1).
- Sposito AJ, K. A. (2018). Application of nanotechnology in biosensors for enhancing pathogen detection. 1(512).
- Steven A.Soper, e. (2006). Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. 21(10).
- SubramanianViswanathan. (2012). Molecular imprinted nanoelectrodes for ultra sensitive detection of ovarian cancer marker. 33(1).
- Tehila Shahar, N. T. (2016). Molecularly imprinted polymer particles: Formation, characterization and application. (495).
- Ul-Haq, Z., Naz, S., & Mesaik, M. A. (2016). Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box.
- Walter MR, C. W. (1992). Estructura cristalina de la interleucina-4 humana recombinante. 267(28).
- Xiaomeng Su, e. (2015). Synthesis and characterization of core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and determination of Rhodamine B in food. (171).
- Xingshou Pang, e. (2006). Soft-wet polyacrilamide gel beads with the imprinting of bovine serum albumin. 66(1182-1188).
- Yantian Wang, e. (2010). Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses. 146(1).
- Zhang, H. (2014). Water compatible molecularly imprinted polymers: Promising synthetic substitutes for biological receptors. (55).

