

---

**“Desarrollo y evaluación de sensores  
potenciométricos miniaturizados para biomarcadores  
de cáncer de próstata basados en polímeros de  
impresión molecular”**

**Tesis presentada por:**

**M.C Soane Fernández Puig**

**Para obtener el grado de**

**Doctor en Electroquímica**

**DICIEMBRE, 2019**

# Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

**REALIZADO POR:**

**MC. Soane Fernández Puig**

**DIRIGIDA POR:**

**Dr Abraham Ulises Chávez Ramírez**

## **SINODALES**

**Bibiana Cercado Quezada**

**Presidente**

---

**Firma**

**Jannú Ricardo Casanova Moreno**

**Secretario**

---

**Firma**

**Irma Robles Gutiérrez**

**Vocal**

---

**Firma**

**Arístides Camilo Valdés González**

**Vocal**

---

**Firma**

**Adriana Jheny Rodríguez Méndez**

**Vocal**

---

**Firma**

**Goldie Harikrishna Oza**

**Suplente**

---

**Firma**

## RESUMEN

---

Desde hace unos años el cáncer de próstata (CaP), se ha convertido en una preocupación para la medicina debido a que es la segunda causa de muerte en hombres. Actualmente el antígeno prostático específico PSA (4-10 ng/mL) en sangre es el más empleado para la predicción de esta enfermedad. En la búsqueda de biomarcadores que puedan ayudar en el diagnóstico, la sarcosina ha sido ampliamente estudiada como biomarcador potencial para predecir la progresión del CaP, debido a que se ha investigado que existe una relación entre la progresión de CaP y este analito en orina (80.1–1975.8 ng/mL), por tanto, es vital la detección temprana para el tratamiento exitoso de la enfermedad. Desarrollar un método rápido, sensible y específico para la detección de sarcosina es primordial. En nuestro trabajo se diseñaron sensores potenciométricos para sarcosina utilizando electrodos de estado sólido base epoxi grafito empleando polímeros de impresión molecular como elementos de reconocimiento.

Los sensores se diseñaron empleando como elemento de reconocimiento polímeros de impresión molecular con diferentes monómeros y se empleó un programa de modelado computacional para determinar el monómero de mejor energía de enlace (ácido metacrílico). Los polímeros se probaron en sistemas de extracción en fase sólida (EFS) siendo el polímero IIA, VIIA y PIM –SC I los de mejor capacidad de adsorción:  $9.03 \cdot 10^{-5}$ ;  $8.0 \cdot 10^{-5}$  y  $6.44 \cdot 10^{-4}$  de sarcosina/g de PIM respectivamente, el mejor tiempo de adsorción fue de 90 min y el pH de trabajo fue 7. El mejor disolvente para la elución de sarcosina fue una mezcla ácido acético-metanol 9/1.

Los sensores potenciométricos miniaturizados diseñados se emplearon en la detección de sarcosina. Los resultados de la calibración mediante el método de las adiciones arrojaron que presenta una respuesta Nerstiana en el intervalo de  $8.0 \cdot 10^{-8}$  –  $5.9 \cdot 10^{-5}$  mol/L para el sensor IIA (6 % polímero de 15  $\mu\text{m}$ ). La pendiente obtenida es de -23.7 mv/Dec y los límites de detección del sensor se encuentran en  $2.0 \cdot 10^{-8}$  mol/L con un coeficiente de correlación de 0.985. La detección es dependiente del pH siendo el pH 7 el empleado para las determinaciones, el tiempo de respuesta del sensor es de 30 s y su tiempo de vida de 6 meses. Los sensores son selectivos a sarcosina en presencia de otros compuestos (biotina, histidina, ácido úrico y glicina) a excepción de la creatinina con un  $K_{A,B} \text{Pot}$  (0.2). Por los resultados obtenidos podemos decir que los sensores obtenidos son selectivos a sarcosina y se podrían emplear en la detección de este biomarcador en muestras de orina de pacientes con CaP.

## ABSTRACT

---

For a few years, prostate cancer (PCa) has become a concern for medicine, because it is the second leading cause of death in men. Currently the antigen prostatic specific PSA (4-10 ng / mL) in blood is the most used for the prediction of this disease. In the search for biomarkers that can help in the diagnosis, sarcosine has been widely studied as a potential biomarker to predict the progression of PCa, because it has been investigated that there is a relationship between the progression of PCa and this analyte in urine (80.1–1975.8 ng/mL), by therefore, early detection is vital for the successful treatment of the disease. Developing a fast, sensitive and specific method for the detection of PCa is paramount. In our work, potentiometric sensors for sarcosine were designed using graphite epoxy based solid state electrodes using molecular imprinted polymers as recognition elements.

The sensors were designed using molecular printing polymers with different monomers and a computational modelling program was used to determine the best binding energy monomer (methacrylic acid). The polymers were tested in solid phase extraction systems (SPE) with polymer IIA, VIIA and PIM -SC I with the best adsorption capacity  $9.03 \cdot 10^{-5}$ ,  $8.08 \cdot 10^{-5}$  and  $6.44 \cdot 10^{-4}$  mg / g respectively, the best adsorption times was 90 min and the working pH was 7. The best solvent for the elution of sarcosine was an acetic acid-methanol mixture 9/1.

The miniaturized potentiometric sensors designed were used in the detection of sarcosine. The results of the calibration by the addition method showed that it has a Nerstian response in the range of  $8 \cdot 10^{-8}$  -  $5.9 \cdot 10^{-5}$  mol / L for the IIA sensor (6 % polymer of 15  $\mu$ m). The slope obtained was -23.7 mv / Dec and the detection limits of the sensor are at  $2.0 \cdot 10^{-8}$  mol / L with a correlation coefficient of 0.985. The detection is dependent on the pH, 7 was the pH used for the determination and the response time of the sensor is 30 s and its life time of 6 months. The sensors are selective to sarcosine in the presence of other compounds (biotin, histidine, uric acid and glycine) with the exception of creatinine with a **K<sub>A, B</sub> Pot** (0.2). From the results obtained we can say that the sensors obtained are selective to sarcosine and could be used in the detection of this biomarker in urine samples from patients with PCa.



**Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación  
y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ),  
bajo la dirección**

**Dr. Abraham Ulises Chávez Ramirez**

**co-dirección**

**Dr Arístides Camilo Valdés González**

El presente trabajo se realizó en el ***CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA***, Bajo la dirección del Dr Abraham Ulises Chávez Ramírez y la co-dirección del Dr Arístides Camilo Valdez González.

Agradezco al ***CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA***, al ***CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA*** por el apoyo económico brindado y las facilidades materiales brindadas para la realización del presente proyecto.

**No debemos tener miedo a equivocarnos,  
hasta los planetas chocan y del caos  
nacen las estrellas**  
"Charles Chaplin"

**Hay una fuerza motriz más poderosa  
que el vapor, la electricidad y la  
energía atómica: la voluntad.**

**El crecimiento intelectual debe  
comenzar solo en el nacimiento y  
solo cesar con la muerte.**

"Albert Einstein"

## AGRADECIMIENTOS

Es maravilloso soñar algo y lograrlo, es lindo levantarse cada día y agradecer a la vida por todo lo que te da. Este **examen de grado** es más que un mero ejercicio, muchos no conocen el enorme sacrificio que conlleva un acto como el que se está desarrollando hoy, noches en vela, estrés, experimentos fallidos, dudar sobre ti mismo, en fin. Puedo sentirme afortunada por todos los amigos que tengo, pocos pero los mejores. Es por eso que este día quiero agradecer a todas las personas que confiaron en mí desde el inicio de este viaje.

### ***A mi familia:***

En primer lugar a mi **madre Sonia**: has sido mi guía, mi ejemplo, no te cambiaría por otra, aunque mi estrés diga lo contrario.

A mi familia toda en especial a mis tías **Mayra, Elizabeth** son especiales me tocaron las mejores.

A mis hermanos **Yanaís y Roger** que siempre están pendientes de mí y ayudando en lo que pueden, molestando también, pero así los quiero.

A mis sobrinos no puedo querer más que esos niños maravillosos.

### ***A mi esposo***

A mi esposo **Ariel** por su grandísimo apoyo y por estar a mi lado en todo momento, gracias por acompañarme por aguantar mis malos humores, mis ganas de dejarlo todo y ser mi apoyo. Gracias por quererme tanto.

### ***A mis tutores y profesores:***

**Abraham y Camilo** que más que llevarme de la mano y enseñarme que la Investigación es bella, levantaron mi autoestima cuando creí que no iba a tener fuerzas para terminar.

**A Toki** como cariñosamente le decimos por sus acertados consejos y la ayuda prestada.

A la **profe Pilar** persona maravillosa, más que su estudiante me trató como su familia.

### ***A mis sinodales:***

**Irma, Bibiana, Jannú, Jheny**, gracias por acompañarme en cada uno de mis pasos, mis seminarios académicos. Por darme una sugerencia acertada en cada momento.

***A mis amigos:***

A mis amigos incondicionales ***Lisbet, Yaremis, Yanio***, por siempre darme aliento, escucharme regañarme cuando hace falta y saber que tengo un hombro para llorar o reír.

A los que me acompañaron en este viaje amigos nuevos que este país maravilloso me dejó conocer ***Pine, Alonso, Juan de Dios, Geyla, Chuy, Ingrid, Lalo, Marta, Jannú, Euth, Polett, Martín*** ese ***SEQE*** maravilloso que me hizo sobrellevar mi estancia.

A ***Rosy, Azucena, Rubí, Armando, Lety, Diana, Victor, Miguel, Jan, Isaac, Isaías, Arturo, Fabiola, Aby, Lalo, Trini***, gracias por invitarme a sus convivios y hacerme sentir uno más de ustedes.

A ***Alberto, Dennys, Leydis, Erick, Ruslán, Montse, Olivia, Lissy, Rulo, Ramón, Juanita, Raúl*** gracias por estar ahí y formar parte de mi vida.

Al grupo de la UNESP Araraquara ***Douglas, Gerson, Lucas, Caio, Mariana, Sabir, Shakeel, Rajabo, Andresa, Carolina y mis amigos cubanos Daylin, Alexander*** que bien lo pasé con ustedes, sino no hubiera podido tener una estancia tan grata gracias a todos.

***A México:***

A este maravilloso país que me abrió las puertas incondicionalmente para que me pudiera superar y lograr parte mis sueños. A ***Cideteq*** por el acceso a sus instalaciones para poder desarrollar mis experimentos.

Y por último, a cada una de las personitas que de una forma u otra estuvieron allí cuando lo necesité y me tendieron su mano amiga. Sé que quedaron algunos pero sepan que están en mi corazón.

***A todos muchas gracias.***

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>CaP</b>	Cáncer de Próstata
<b>PSA</b>	Antígeno Prostático Específico (Prostatic Specific Antigen, por sus siglas en inglés)
<b>DRE</b>	Análisis digital del recto (Digital Rectal Analysis, por sus siglas en inglés)
<b>HBP</b>	Hiperplasia Benigna de Próstata
<b>hk2</b>	Calicreína 2
<b>PTEN</b>	Homólogo de la fosfatasa y tensina
<b>EPCA</b>	Antígeno Temprano de Cáncer de Próstata (Early Prostatic Cancer Antigen, por sus siglas en inglés)
<b>PSMA</b>	Antígeno Específico de Membrana (Prostatic Specific Membrane Antigen, por sus siglas en inglés)
<b>PCA3</b>	Antígeno prostático del cáncer ( Prostatic Cancer Antigen, por sus siglas en inglés)
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, por sus siglas en inglés)
<b>ESI</b>	Electrodo selectivo a iones
<b>AMACR</b>	$\alpha$ metilacil CoA racemasa ( $\alpha$ metilacil CoA racemase, por sus siglas en inglés)
<b>SPINK1</b>	Serina proteasa inhibidor Kazal-tipo 1( Serine protease inhibitor Kazal- type 1, por sus siglas en inglés)
<b>GOLPH2</b>	Golgi phosphoprotein 2 (Fosfoproteína Golgi 2,por sus siglas en inglés)
<b>TFF3</b>	Factor de crecimiento derivado del epitelio de Leri (Leri epitheliumm-derivated growth factor, por sus siglas en inglés)
<b>XAGE1b</b>	Antígeno de la familia G, miembro 2 (G antigen family D, member 2)
<b>SSX-2,4</b>	Gen tipo 2 y tipo 4
<b>NY-ESO1</b>	Antígeno de cáncer testicular

<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionario (Carcinoembryonic antigen Antigen, por su siglas en inglés)
<b>PIM</b>	Polímero de impresión molecular
<b>PIN</b>	Polímero no impreso
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>mARN</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>DFT</b>	Teoría del funcional de la densidad (DFT por sus siglas en inglés)
<b>LD</b>	Límite de detección
<b>LOC</b>	Lab on a chip (por sus siglas en inglés)
<b>UPLC-MS</b>	Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass (Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a masas, por sus siglas en inglés)

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>4</b>
2.1	Objetivo general	4
2.2	Objetivos específicos	4
<b>3</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>5</b>
3.1	Biomarcadores para el CaP	5
3.2	Sarcosina	8
3.3	Sensores	9
3.3.1	Sensores electroquímicos potenciométricos	12
3.3.2	Mecanismo de trabajo de los ESI	15
3.4	Polímeros de impresión molecular	19
3.5	Estudio de la interacción monómero plantilla	21
3.6	Tecnología Lab on a chip	23
3.7	Justificación	25
<b>4</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>26</b>
4.1	Reactivos, disoluciones y equipos	26
4.1.1	Reactivos	26
4.1.2	Disoluciones	27
4.1.3	Equipos	27
4.2	<b>Parte experimental</b>	<b>28</b>
4.2.1	Selección de la molécula plantilla	29
4.2.2	Estudio de la interacción monómero plantilla	29
4.2.3	Síntesis de los polímeros de impresión molecular	30
4.2.3.1	Caracterización morfológica de los PIM	33
4.2.3.2	Evaluación de las propiedades de reconocimiento	34
4.2.3.3	Metodología de determinación de sarcosina por UPLC-MS	35
4.3	<b>Construcción de los cuerpos de los electrodos</b>	<b>37</b>
4.3.1	Activación de las membranas y calibración de los electrodos	37
4.4	Caracterización analítica	37

<b>4.4.1</b>	Influencia del pH	<b>37</b>
<b>4.4.2</b>	Tiempo de respuesta	<b>38</b>
<b>4.4.3</b>	Tiempo de vida	<b>39</b>
<b>4.4.4</b>	Estudio de posibles interferentes	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>40</b>
<b>5.1</b>	Selección de la molécula plantilla	<b>40</b>
<b>5.2</b>	Estudio de la interacción monómero plantilla	<b>41</b>
<b>5.3</b>	Síntesis de los polímeros de impresión molecular PIM	<b>41</b>
<b>5.3.1</b>	Caracterización morfológica	<b>41</b>
<b>5.3.2</b>	Evaluación de las propiedades de reconocimiento de los PIM	<b>47</b>
<b>5.4</b>	Caracterización analítica de los PIM	<b>50</b>
<b>5.4.1</b>	Efecto del tiempo de contacto	<b>50</b>
<b>5.4.2</b>	Efecto del pH	<b>50</b>
<b>5.4.3</b>	Capacidad de sorción	<b>51</b>
<b>5.4.3.1</b>	Polímeros empleados para Extracción en Fase Sólida (EFS)	<b>52</b>
<b>5.4.3.1.1</b>	Eficiencia del disolvente	<b>52</b>
<b>5.4.3.2</b>	Selectividad del PIM	<b>53</b>
<b>6</b>	Construcción y evaluación de los sensores potenciométricos	<b>56</b>
<b>6.1</b>	Construcción del cuerpo de los electrodos	<b>56</b>
<b>6.1.1</b>	Evaluación del funcionamiento del transductor	<b>56</b>
<b>6.2</b>	Caracterización morfológica de la membrana	<b>57</b>
<b>6.3</b>	Calibración de los sensores	<b>59</b>
<b>6.3.1</b>	Caracterización analítica del sensor	<b>61</b>
<b>6.3.2</b>	Influencia del pH del medio	<b>61</b>
<b>6.3.3</b>	Tiempo de respuesta	<b>63</b>
<b>6.3.4</b>	Tiempo de vida	<b>63</b>
<b>6.3.5</b>	Selectividad del sensor	<b>64</b>
<b>6.3.6</b>	Aplicación analítica	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>67</b>
	<b>Perspectivas</b>	<b>68</b>
	<b>Anexo 1</b>	<b>69</b>

	<b>Anexo 2</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Partes fundamentales de un sensor</i>	<b>10</b>
<b>Figura 2</b>	<i>Componentes de las lenguas electrónicas</i>	<b>11</b>
<b>Figura 3</b>	<i>Típica distribución de componentes en una membrana polimérica</i>	<b>15</b>
<b>Figura 4</b>	<i>Montaje experimental para realizar las medidas potenciométricas</i>	<b>16</b>
<b>Figura 5</b>	<i>Mecanismo de detección de límite de fase</i>	<b>18</b>
<b>Figura 6</b>	<i>Representación esquemática del proceso de impronta molecular</i>	<b>20</b>
<b>Figura 7</b>	<i>Sistema microfluídico con tecnología Lab on Chip</i>	<b>24</b>
<b>Figura 8.</b>	<i>Estructura y nube electrónica de a) ácido metacrílico b) sarcosina c) 4 vinilpiridina</i>	<b>30</b>
<b>Figura 9</b>	<i>Representación del proceso de impronta molecular en bloque convencional</i>	<b>30</b>
<b>Figura 10</b>	<i>Representación del proceso de impronta molecular core@shell</i>	<b>32</b>
<b>Figura 11</b>	<i>Esquema de los electrodos confeccionados</i>	<b>36</b>
<b>Figura 12</b>	<i>Propiedades ácido base de la sarcosina</i>	<b>38</b>
<b>Figura 13</b>	<i>Estudio de la influencia del pH empleando una celda de flujo</i>	<b>38</b>
<b>Figura 14</b>	<i>Micrografías de los polímeros obtenidos</i>	<b>44</b>
<b>Figura 15</b>	<i>Isotermas de sorción de N<sub>2</sub> de los PIM convencionales</i>	<b>46</b>
<b>Figura 16</b>	<i>Isotermas de sorción de N<sub>2</sub> de los PIM core @shell</i>	<b>47</b>
<b>Figura 17</b>	<i>Porcentaje de sarcosina en solución de lavado de los polímeros</i>	<b>48</b>
<b>Figura 18</b>	<i>Influencia del tiempo en la sorción de sarcosina</i>	<b>50</b>
<b>Figura 19</b>	<i>Efecto del pH en la respuesta del sensor</i>	<b>51</b>
<b>Figura 20</b>	<i>Efecto de la concentración de sarcosina en la sorción de los polímeros</i>	<b>52</b>

<b>Figura 21</b>	<i>Estructura de los compuestos interferentes</i>	<b>54</b>
<b>Figura 22</b>	Miniaturización de electrodos	<b>56</b>
<b>Figura 23</b>	<i>Micrografías de las membranas</i>	<b>58</b>
<b>Figura 24</b>	<i>Calibración de los sensores a distintos tiempos de activación</i>	<b>59</b>
<b>Figura 25</b>	<i>Calibración de los sensores con distintos porcentajes de elemento de reconocimiento</i>	<b>60</b>
<b>Figura 26</b>	<i>Efecto del pH</i>	<b>62</b>
<b>Figura 27</b>	<i>Tiempo de respuesta del sensor</i>	<b>63</b>
<b>Figura 28</b>	<i>Calibración de los sensores durante 6 meses</i>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<i>Clasificación IUPAC de los ESI según el tipo de membrana que utilizan</i>	<b>12</b>
<b>Tabla 2</b>	<i>Composición de los diferentes polímeros sintetizados</i>	<b>31</b>
<b>Tabla 3</b>	<i>Composición de los polímeros en formato core @shell</i>	<b>33</b>
<b>Tabla 4</b>	<i>Composición de la membrana sensora</i>	<b>36</b>
<b>Tabla 5</b>	<i>Resumen de biomarcadores de CaP</i>	<b>41</b>
<b>Tabla 6</b>	<i>Energía de interacción del monómero- sarcosina</i>	<b>42</b>
<b>Tabla 7</b>	<i>Análisis superficial de los polímeros en bloque</i>	<b>45</b>
<b>Tabla 8</b>	<i>Análisis superficial de los polímeros core @shell</i>	<b>47</b>
<b>Tabla 9</b>	<i>Resultado reenlace PIM</i>	<b>49</b>
<b>Tabla 10</b>	<i>Resultados reenlace de los PIM core @shell</i>	<b>49</b>
<b>Tabla 11</b>	<i>Efecto del eluente en la sorción de sarcosina</i>	<b>53</b>
<b>Tabla 12</b>	<i>Efecto del eluente en la extracción de sarcosina</i>	<b>53</b>
<b>Tabla 13</b>	<i>Porcentajes de recobrado en la elución de compuestos interferentes</i>	<b>54</b>
<b>Tabla 14</b>	<i>Valores promedio de la resistencia eléctrica de los electrodos</i>	<b>57</b>
<b>Tabla 15</b>	<i>Caracterización de los sensores con distintos tamaños de partícula</i>	<b>61</b>
<b>Tabla 16</b>	<i>Coefficiente de selectividad del sensor</i>	<b>65</b>
<b>Tabla 17</b>	<i>Medición de muestras con los sensores</i>	<b>65</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Hace algunas décadas las enfermedades cancerígenas, han estado afectando la calidad de vida del hombre, siendo consideradas una de las principales causas de mortalidad y morbilidad <sup>1</sup>. Entre los tipos de tumores malignos causantes de cáncer, el de próstata (CaP) es el más común encontrado en hombres, por lo que se estima que 1 de cada 7 será diagnosticado con este tipo de cáncer en el transcurso de su vida <sup>2</sup>.

En México, el CaP es el segundo más común encontrado en hombres. Las cifras oficiales (2019) indican que casi 7 mil mexicanos mueren anualmente por ese padecimiento, siendo reportados entre 21 y 25 mil nuevos casos al año, lo que posiciona a este padecimiento como un grave problema de salud pública.

El CaP es un padecimiento que se origina como consecuencia del desarrollo de células cancerosas en la glándula prostática, este desarrollo de células tumorales generalmente ocurre después de los cincuenta años de edad. La detección de CaP podría y debería ser oportuna, lo que incrementaría sustancialmente la tasa de supervivencia a la enfermedad, la falta de una cultura en medicina preventiva, los mitos y prejuicios “machistas” asociados al procedimiento de diagnóstico más empleado, el análisis digital del recto, le permiten desarrollarse hasta alcanzar altas cotas de mortalidad. Debido a esto, los investigadores han ido desarrollando estrategias terapéuticas, en función de mejorar la calidad de vida de los pacientes después de su diagnóstico y tratamiento. A pesar de estos esfuerzos, hoy día, la sobrevivencia sigue siendo muy baja <sup>3</sup>.

El CaP, según los estudios realizados, es una enfermedad heterogénea. Se trata de tumores que progresan de manera asintomática, en la mayoría de los casos, por lo que pueden ser imperceptibles o muy agresivos y como consecuencia de esto, las manifestaciones clínicas sólo aparecen cuando la enfermedad es sistémica <sup>4</sup>. Por esta razón, alrededor del 92 % de la diagnosis es realizada cuando la enfermedad se encuentra en la próstata y en los órganos adyacentes, en el denominado estadio local o regional, según el Instituto Mexicano de Seguridad Social (IMSS)<sup>5</sup>. De acuerdo al IMSS, sólo en el 2014 se diagnosticaron alrededor de 233,000 nuevos casos, el 60 % de los cuales se detectó ya en etapas avanzadas, provocando la mortalidad de alrededor de 80 mil mexicanos, muchos de los cuales habrían podido sobrevivir si se contara con un sistema de detección temprana. Anualmente 6 de cada 10 casos se diagnostican en hombres de 65 años o más y en pocas ocasiones se presenta antes de los 40 años <sup>6</sup>. Uno de los principales retos en este tipo de enfermedad es desarrollar pruebas de diagnóstico eficientes en etapas tempranas.

Los métodos de diagnóstico más comunes empleados para la detección del CaP son: el examen digital del recto (DRE) y la prueba del antígeno específico de la próstata (PSA) <sup>7</sup> las cuales presentan una sensibilidad y especificidad limitada <sup>8</sup>. En el caso del DRE, la eficacia del diagnóstico dependerá de la experiencia y habilidad del especialista que lo realiza, para discriminar si el aumento de la próstata es producido por alguna de las diferentes patologías que puede presentar la próstata: hiperplasia, inflamación o infección prostática, entre otras afecciones y la prueba del PSA, pese a que se considera un marcador tumoral efectivo, su aumento no siempre asegura que exista CaP, lo cual hace que su especificidad no sea muy elevada. Se ha demostrado que debido a la inespecificidad de estas pruebas aproximadamente el 75 % de las biopsias transrectales realizadas dan resultados negativos <sup>9-10</sup>. Esto representa una consecuencia negativa para el paciente debido a que pueden existir complicaciones en la toma de muestra, como alto riesgo de infección, malestar e incomodidad y la angustia de saber que puedes estar padeciendo de esta enfermedad <sup>11-12</sup>.

La alta prevalencia de CaP, su heterogeneidad y las distintas vías moleculares potencialmente implicadas en su patogénesis, hacen improbable que un único marcador molecular tenga una sensibilidad y especificidad suficientemente alta para considerarlo idóneo. Por lo tanto, resulta de particular interés mejorar la capacidad para pronosticar y predecir esta mortal enfermedad. Esto conlleva a la investigación de nuevos biomarcadores y el desarrollo de herramientas tecnológicas para su detección. En los últimos años han comenzado a publicarse trabajos donde se realiza la detección de combinaciones de varios marcadores en sangre y/o en el orina que sumados, aumenten la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico del CaP <sup>13-14</sup>.

En el presente trabajo se propone obtener electrodos potenciométricos miniaturizados que puedan determinar biomarcadores potenciales de CaP basados en polímeros de impresión molecular (PIM). Estos últimos actuarán como elemento de reconocimiento del analito seleccionados presente en fluidos biológicos (suero u orina).

Tomando en consideración la importancia y actualidad que tiene el desarrollo de nuevos y mejores materiales (PIM) para la detección de biomarcadores que identifiquen el CaP, la importancia de incorporarlos a la detección, las facilidades de los sistemas para la miniaturización y el haber encontrado muy poca literatura sobre la detección de selectiva de biomarcadores empleando PIM se puede reconocer el siguiente **problema científico**:

***Problema científico:***

Los sistemas de detección actuales resultan poco eficientes para el diagnóstico de CaP de forma específica y en etapa temprana.

***Hipótesis***

El desarrollo de PIMs y su empleo como portador móvil en la construcción de sensores potenciométricos miniaturizados brindarán una solución tecnológica de alta sensibilidad, especificidad y rápida respuesta para la detección de biomarcadores relacionados con el CaP.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Desarrollar electrodos miniaturizados potenciométricos empleando PIM como elemento de reconocimiento de biomarcadores de CaP.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Seleccionar la molécula plantilla (biomarcador) más adecuada con base en la revisión bibliográfica
2. Sintetizar los polímeros de impresión molecular de tipo acrílico para los biomarcadores seleccionados
3. Caracterización físico química de los materiales obtenidos por diferentes técnicas
4. Desarrollar sensores potenciométricos de membrana líquida empleando los PIMs sintetizados
5. Caracterizar analíticamente los sensores
6. Evaluación operacional del sensor

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Biomarcadores para la detección de CaP

A pesar de las limitaciones del PSA, actualmente se sigue empleando para la detección del CaP. Este biomarcador es una serina proteasa producida por el epitelio de la próstata que se utiliza en oncología como un biomarcador no específico para el premonitoreo del CaP cuando sus valores se encuentran en concentraciones de 4 a 10 ng/mL <sup>15</sup>. Aunque la concentración del PSA se eleva en pacientes con CaP también puede elevarse en pacientes con tumores benignos, con hiperplasia benigna de próstata (HBP), prostatitis y asociado a factores como la edad e infecciones etc, de ahí la baja especificidad. Es por ello que se están considerando una serie de biomarcadores, más efectivos para emplearlos como herramientas de apoyo para la detección del CaP. En este sentido, hay un grupo de biomarcadores del tipo proteómico, metabolómico y genómico que han sido objeto de estudio. De los más de mil metabolitos estudiados <sup>16</sup> hay un pequeño grupo que se destaca debido a que se incrementan significativamente cuando hay presencia de CaP: la prolina, kiurenina, glicerol 3 fosfato, leucina, creatinina, uracil, glicina y el metabolito secundario sarcosina; otros biomarcadores como la calicreína 2 (hk2), el antígeno temprano de cáncer de próstata (EPCA), el antígeno específico de membrana (PSMA), el antígeno prostático del cáncer (PCA3), el homólogo de la fosfatasa y tensina PTEN y la fusión del gen TMPRSS2-ERG incrementan su concentración cuando hay tumores presentes en la próstata.

El EPCA es una proteína que se eleva cuando hay presencia de CaP <sup>17-18</sup> su detección en muestras de suero permite diferenciar entre la enfermedad local y extra prostática, además, establecer si el paciente se encuentra sano o tiene CaP. Aunque se han hecho pruebas y se ha determinado que es un marcador más específico que el PSA, aún no es lo suficientemente confiable para reemplazar al PSA en el diagnóstico de tumores prostáticos. El PSMA es una glicoproteína que se encuentra en el tejido prostático sano y con tumoración <sup>17-18</sup>. Este anticuerpo se ha empleado con un anticuerpo monoclonal marcado con In<sup>111</sup> para detección in vivo de CaP en tejido y en suero; adicionalmente permite diferenciar grado de tumor y estadio de la enfermedad. Su limitación radica en que aún no se ha establecido si es mejor predictor de la enfermedad que el PSA, por lo que se encuentra en estudio. El PTEN es un gen supresor del tumor localizado en el cromosoma 10, que normalmente esta presente en el tejido prostático <sup>13-14, 19</sup>. Su detección en sangre es asociada con cáncer positivo y recurrencia, siendo empleado, junto con TMPRSS2 para la predicción de la enfermedad. Por otra parte, el PCA3

es un gen que resulta elevado en más del 90% de los casos de CaP, mientras que resulta normal en otras patologías no malignas <sup>13-14, 19-20</sup>. La Food and Drugs Administration (FDA) ha probado el uso del PCA3 con un punto de corte de 25 como indicador de necesidad de biopsia en pacientes con niveles de PSA entre 2.5-10 ng/mL y pacientes con biopsias previas negativas y cifras de PSA persistentemente elevadas, lo que indica su valor predictivo negativo (90 %), sensibilidad de 77.5 %, especificidad de 51.7 % y el valor predictivo positivo de 33.6 %. El TMPRSS-2 suele combinarse con el PCA3, un producto derivado de la fusión del gen TMPRSS-2 con el factor de transcripción ERG. Dicho producto corresponde a una serino proteasa transmembrana tipo II que se expresa de forma normal en el epitelio prostático y ha sido involucrada en procesos patológicos como el CaP. Sin embargo, su función biológica es aún desconocida. Estos nuevos compuestos tienen múltiples ventajas sobre el PSA ya que predicen el riesgo de enfermedad y su detección evita biopsias innecesarias. En el caso del PCA3, aunque su concentración es independiente del tamaño de la próstata, para la determinación del punto de corte aún depende de la determinación del mRNA (ácido ribonucleico mensajero) del PSA para establecer el valor que se correlaciona con la necesidad o no de biopsia en pacientes con CaP. Otros biomarcadores como la sarcosina (N-metilglicina), se ha comprobado que la concentración de este biomarcador se incrementa significativamente en los pacientes durante la progresión del CaP <sup>13, 21-22</sup>. La relación entre los cambios en los niveles de concentración de sarcosina en la orina humana en el desarrollo de CaP fue publicado por primera vez en 2009 por Sreekumar *et. al.* <sup>16</sup>. Por su parte, el grupo de Struys *et. al.* <sup>23</sup>, realizó un estudio preliminar donde determinó que la detección de este biomarcador en sangre tiene más potencialidades para ser empleado para el diagnóstico, debido a que aumenta su concentración cuando hay tumores prostáticos presentes. Además, otro estudio realizado por Isaaq *et. al.* <sup>24</sup>, corrobora que en sangre hay más posibilidades de detectarla y a diferencia de los otros metabolitos es el más estudiado, debido a que tiene más potencialidades para ser empleado como predictor de la enfermedad. Otro marcador que promete ser un buen candidato para su estudio es la hk2 <sup>13, 17-18, 25</sup>, la cual es una glicoproteína del grupo de las calicreínas humanas y está localizada en la próstata. La hk2 es más específica del tumor que el PSA y se expresa a niveles más altos en el tejido prostático canceroso. También se ha comprobado que la concentración del precursor (pro hk2) se encuentra elevado en suero de pacientes con CaP y en el tejido prostático canceroso comparado con el tejido de la HBP o el tejido prostático normal <sup>26</sup>. Adicionalmente, estos marcadores resultan ser más específicos de los tumores prostáticos, con muy pocas probabilidades de ser encontrados en otros tipos de células cancerígenas.

En años recientes se han realizado varios intentos de detectar múltiples biomarcadores de CaP con el objetivo de desarrollar dispositivos automáticos para su detección en suero, orina o tejido. Este es el caso de grupos como el de S. Simpa Salami *et. al.* <sup>27</sup> que desarrollaron un algoritmo clínico que combina la detección urinaria de TMPRSS2: ERG y PCA3 con la de PSA en suero para predecir el CaP. Bharathi Laxman *et. al.* <sup>28</sup> crean la primera generación de análisis multiplexados qPCR de biomarcadores que se expresan en etapa temprana (AMACR, ERG, GOLPH2, PCA3, SPINK1, TFF3, y TMPRSS2: ERG). La sensibilidad y especificidad para el modelo multiplexado fue de 65,9 % y 76 % respectivamente y los valores predictivos positivos y negativos fueron 79,8 % y 60,8 %, respectivamente. Por otra parte, Xie Chong *et. al.* <sup>29</sup> identificaron epítopes de células de 6 antígenos previamente asociados a CaP: el NY-ESO-1, XAGE-1b, SSX-2,4,  $\alpha$ - metilacil-CoA racemasa (AMACR), p90 y LEDGF estos se conjugaron con microesferas seroMAP para permitir la medición multiplexada en muestras de suero. Zheng *et. al.* <sup>30</sup> describen la detección eléctrica multiplexada de marcadores de cáncer (PSA, PSA- $\alpha$ 1-antiquimotripsina, antígeno carcinoembrionario (CEA) y mucina-1, utilizando dispositivos de efecto de campo (nanocables de silicio) en los que se incorporan nanohilos como receptores. Los marcadores se detectaron en concentraciones 0,9 pg/ mL con elevada sensibilidad y especificidad en muestras de suero. Estos métodos proporcionan una mejora significativa sobre las técnicas de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) estándar, pueden predecir proliferación de los tumores después de un tratamiento de quimioterapia o quirúrgico, ayudar a los especialistas en el diagnóstico clínico y además evita biopsias innecesarias. Sus desventajas radican, en la mayoría de los casos, en el uso de los antígenos, anticuerpos o enzimas para hacer la medición lo cual hace que la técnica sea de un solo uso y con tiempos limitados debido a caducidad de los biomarcadores como de los reactivos para su determinación, lo que limita su empleo, así como los biomarcadores que determinan por estas técnicas son inespecíficos del CaP. Adicionalmente, hay que procesar las muestras en el laboratorio para la determinación de los analitos y por tanto dependen de personal calificado.

Por otra parte, el análisis de la mayoría de los biomarcadores implica complejas etapas de tratamiento y procesamiento de la muestra, ensayos ELISA, qPCR (reacción en cadena de la polimerasa o transcripción en tiempo real) etc. o con técnicas instrumentales de alto costo, como la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a diferentes sistemas de detección, como fluorescencia, ultravioleta con arreglo de diodos (UV-DAD), o diferentes sistemas de masas y masas en tándem (HPLC/MS, HPLC/MS/MS), electroforesis capilar o cromatografía gaseosa (GC). El empleo de sensores

potenciométricos que emplean PIM como fase sensora, con elevada selectividad, sensibilidad y bajo costo sería una alternativa viable.

### **3.2 Sarcosina**

La sarcosina (N- metilglicina), es un metabolito derivado de la glicina, el cual es un aminoácido natural encontrado en músculos y otros tejidos. Según estudios realizados, este analito podría ser empleado para predecir la presencia del CaP y se ha determinado que se encuentra en suero 5.34–240 ng/mL (0.06 – 2.67  $\mu$ M ) y en la orina en un intervalo de concentración desde 80.1–1975.8 ng/mL ( 0.9 – 22.2  $\mu$ M) <sup>31-32</sup>. En investigaciones recientes, se encontró un nivel alto de sarcosina en la orina de pacientes con CaP, lo que llevó a realizar diversos estudios en los cuales, se ha demostrado que la sarcosina incrementa su concentración durante la progresión y metástasis de esta enfermedad. Por otro lado, se determinó niveles de concentración de sarcosina en pacientes con biopsia negativa y estos fueron más bajos que en pacientes con CaP; así como, los niveles de sarcosina en orina tuvieron mejores resultados que los niveles séricos de PSA para predecir el riesgo de CaP, cuando los niveles de PSA se encuentran en valores entre 2-10 ng / mL <sup>16, 33</sup>.

Actualmente los métodos empleados para determinar la sarcosina son métodos colorimétricos, cromatográficos, métodos cromatográficos acoplados a masas y electroquímicos (menos empleados). Entre los métodos colorimétricos se encuentran los enzimáticos como los empleados por Yamkamon *et. al.* <sup>34</sup> en el cual se emplea la sarcosina oxidasa para la determinación del analito, este método requiere utilizar enzimas con los problemas que conlleva como: trabajar a un pH, temperatura específicas para evitar la desnaturalización de la misma lo que hace el trabajo engorroso y caro <sup>35</sup>. En el caso de la cromatografía usualmente se requiere la derivatización de la molécula. La derivatización es la modificación del analito mediante una reacción química, esto consiste en hacer reaccionar al analito con una molécula derivatizante que le confiere una propiedad ya sea color, fluorescencia o fosforescencia con lo que se facilita su determinación y depende de la estabilidad del reactivo derivatizante, la reacción y que compuestos con una estructura similar no tengan la misma propiedad que el analito principal, lo que la hace ineficiente <sup>36</sup>. En el caso de los métodos cromatográficos acoplados a masa son métodos altamente sensibles, su desventaja radica en el hecho que son equipos complejos que dependen de personal altamente calificado para su puesta en marcha, la preparación de la muestra es complicada y en ocasiones también se necesita derivatizar la molécula a analizar,

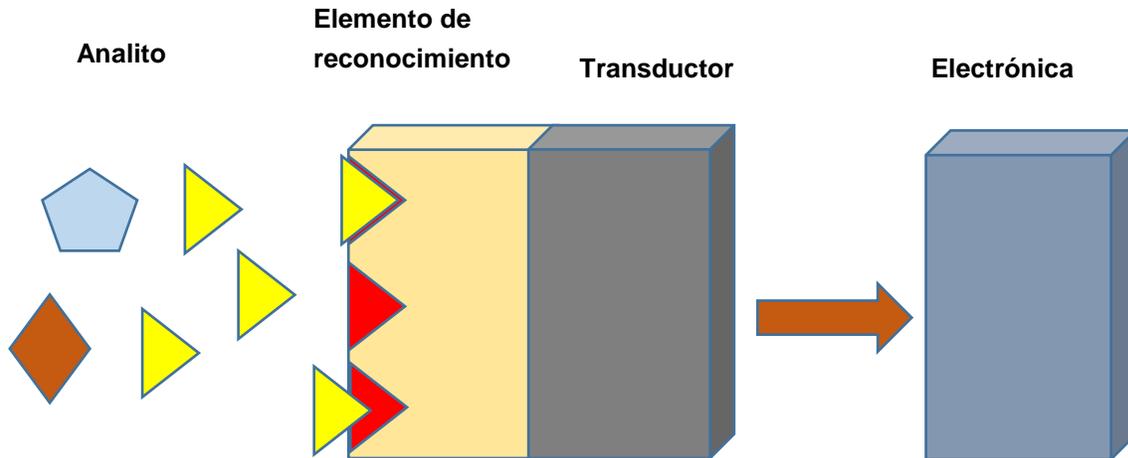
la mayoría de los mismos no están al alcance de análisis rutinarios <sup>37-38</sup>.

En las últimas décadas se ha tratado de determinar la sarcosina con métodos más simples como los sensores electroquímicos, este campo aún esta en sus primeras etapas ya sea intentando la inmovilización de enzimas sobre electrodos <sup>35, 39</sup> lo cual trae sus desventajas asociada (desnaturalización) y tener una metodología de inmovilización que evite emplear los sitios activos de la misma en el proceso. También se han desarrollado sensores impedimétricos en los cuales se inmoviliza una monocapa de polímero impreso por electropolimerización sobre un sensor de nanopartículas de oro (Au) modificado selectivos a sarcosina. Aunque efectivos con bajos límites de detección (LD) tienen varios pasos de inmovilización y emplean Au por lo que resultan poco económicos <sup>40</sup>. Un campo que ha ganado la atención de la comunidad científica es el de los sensores potenciométricos <sup>41</sup> por la fácil preparación de sus componentes, posibilidad de miniaturización y bajo costo.

### **3.3 Sensores**

En la última década, en el área de investigación, así como en la médica, se ha incrementado el interés por realizar análisis de forma sencilla, rápida y económica. Un sensor es un dispositivo de análisis conformado por un elemento de reconocimiento (anticuerpo, aptámero, PIM etc), asociado a un mecanismo de transducción que convierte la interacción del dispositivo con el analito en una señal medible <sup>42</sup>.

Cabe destacar que las características fisicoquímicas del analito de interés son las determinantes para la elección del material biológico/biomimético de reconocimiento. Los sensores están constituidos por 3 componentes fundamentales: un elemento de reconocimiento generalmente inmovilizado en un soporte sólido constituyendo ambos la fase sensora, el transductor, que convierte la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito en una señal medible y la electrónica asociada (Figura 1).

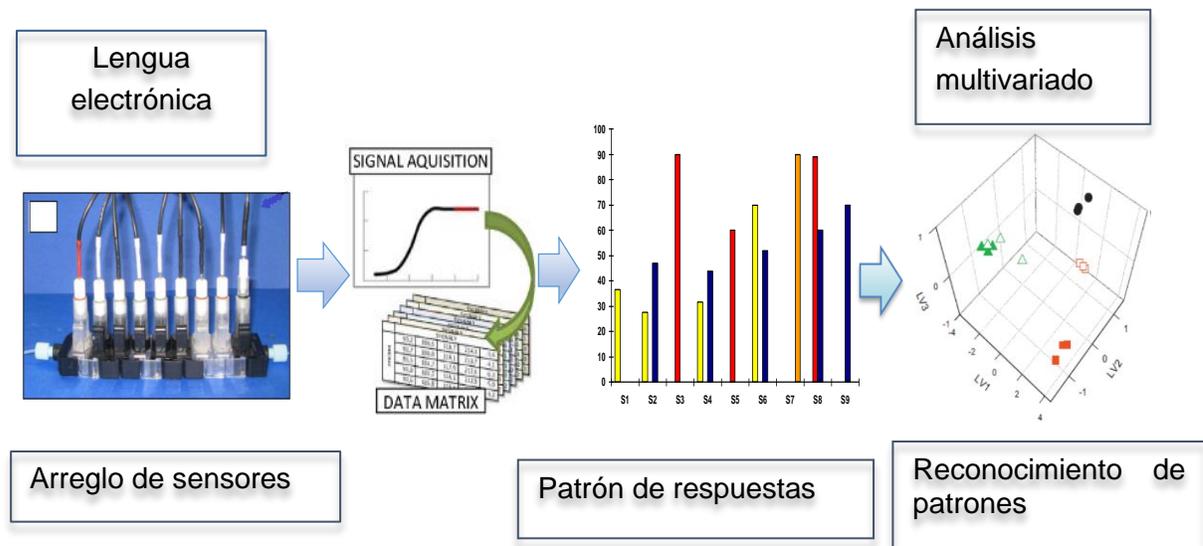


**Figura 1.** Partes fundamentales de un sensor

Un nuevo concepto en el campo de los sensores ha aparecido para facilitar diferentes necesidades de monitoreo. Estos novedosos sistemas conocidos como lenguas electrónicas (e-Ts), emplean un arreglo de sensores no específicos (sensores diferenciales) con selectividad cruzada e incluyen métodos de procesamiento de datos, con el fin de interpretar las respuestas complejas de los sensores y relacionarlas con su significado analítico (*Figura 2*)<sup>43-44</sup>. En general podemos decir que las e-Ts son un conjunto de sensores donde cada uno de los cuales mide una propiedad determinada de la muestra. La respuesta del conjunto de sensores ofrece una huella característica para cada especie. Para evaluar la capacidad de las e-Ts como método para cuantificar las concentraciones de distintos componentes a determinar en una muestra, se llevan a cabo varios análisis multivariantes mediante un programa. En primer lugar, se realizan análisis de los componentes principales (CAP) para poder visualizar los datos de forma sencilla y detectar posibles datos anómalos (outliers) cuyo comportamiento difiere del resto. En segundo lugar, se hacen análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) que maximizan la correlación entre variables independientes y dependientes. El objetivo es generar un modelo referencia que permita cuantificar dichas respuestas a partir de los valores de las medidas obtenidas. La suma de todas las huellas permite establecer un patrón de reconocimiento para cada sabor.

El funcionamiento de las e-Ts es muy semejante al de las papilas gustativas humanas, donde el cerebro es el encargado procesar los datos enviados por los receptores y de interpretar la respuesta que los relaciona con un sabor determinado. Estos sistemas de análisis a igual que las lenguas

biológicas se someten a un sistema de aprendizaje para que inequívocamente puedan distinguir un sabor determinado o discriminar CaP de HBP u otras afecciones de la próstata.



**Figura 2.** Componentes de las lenguas electrónicas

La investigación y desarrollo de las e-Ts es actualmente muy extensa. Debido a las ventajas que proporcionan estos sistemas, en la actualidad algunos grupos de investigación las han empleado para distintos fines como la determinación de contaminantes ambientales, fármacos<sup>45</sup> y biomarcadores del CaP, entre otros<sup>43, 46</sup>. También han sido empleadas narices electrónicas (similar a las e-Ts, pero para el análisis de muestras gaseosas), para la detección de CaP. Como un primer intento, Antti Roine *et al.*<sup>47</sup> emplearon una nariz electrónica comercial (ChemPro 100-eNose), utilizada usualmente para el análisis de agua, para discriminar CaP de HBP en orina. El dispositivo empleado utiliza como elemento de reconocimiento sensores de óxidos metálicos semiconductores y detectores de movilidad iónica. Las limitaciones de este dispositivo radican, en que los sensores empleados en el sistema responden a cualquier analito por lo que hay que emplear una herramienta quimiométrica (como el análisis de discriminación lineal), para la interpretación de los resultados, volatilizar la muestra por espacio cabeza (headspace) y además calentar el sistema (200-350 °C) para su funcionamiento. Las e-Ts también se han comenzado a emplear en el sensado de algunos biomarcadores de CaP<sup>48-49</sup>.

Entre los tipos de sensores más utilizados para las e-Ts son los asociados con transducción electroquímica, entre ellos los potenciométricos, voltamperométricos. Por otra parte se encuentran los ópticos<sup>50</sup>. Entre los primeros se encuentran los potenciométricos basados en electrodos selectivos a

iones (ESI), transistores de efecto de campo sensibles a iones (ion selective field effect transistor, ISFET, por sus siglas en inglés) que son un híbrido entre los electrodos selectivos a iones y los transistores de efecto de campo metal-óxido (MOSFET metal – oxide field effect transistor, por sus siglas en inglés), los conductimétricos y los amperométricos.

### 3.3.1 Sensores electroquímicos potenciométricos

Los sensores electroquímicos potenciométricos son aquellos en los cuales la señal obtenida de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento, es un potencial eléctrico. Esta medidas se basan en la determinación de la diferencia de un potencial eléctrico en condiciones de circuito abierto (corriente nula) entre un electrodo indicador y uno de referencia <sup>51</sup>. La medición realizada con los sensores potenciométricos se relaciona directamente con la actividad de las especies en disolución y en el caso de disoluciones diluidas y especies neutras se aproxima la actividad a la concentración <sup>52</sup>.

Los ESI, son un tipo de sensor electroquímico que permite la determinación potenciométrica de las actividades de iones o especies neutras. Están formados básicamente por una fase sensora asociada a un transductor (Figura 2). Estas fases son películas delgadas o membranas permeoselectivas.

**Tabla 1.** Clasificación IUPAC de los ESI según el tipo de membrana que utilizan

Electrodos selectivos de iones					
Primarios				Compuestos	
Cristalinos		No cristalinos			
Membrana homogénea	Membrana Heterogénea	Matriz rígida	Portador móvil -carga + -carga – -neutro -Par iónico hidrofóbico	Sensibles a gases	De sustrato enzimático

El funcionamiento de un ESI se basa en la variación del potencial entre la superficie de la membrana y la disolución, generando una señal debida a la interacción del ion o especie a determinar con el elemento de reconocimiento, que se encuentra confinado en el seno de la membrana. La variación de

la señal depende de la concentración de analito presente <sup>53</sup>. La ecuación fundamental de trabajo de un sensor potenciométrico que relaciona la medida con la especie química medida es la ecuación de Nernst (Ecuación 1), que relaciona cuantitativamente el potencial del electrodo con la actividad de la especie e indirectamente permite calcular el cambio de potencial. Cuando un sensor presenta una respuesta que se ajusta a dicho modelo se dice que tiene un comportamiento nerstiano.

### **Ecuación 1:**

$$E = E_0 + \underline{S} \log a_i$$

#### **Donde:**

**E:** potencial de la celda (mV)

**E<sup>0</sup>:** potencial estándar (mV)

**a<sub>i</sub>:** actividad del ión que se analiza

$$a_i = \gamma_i [i]$$

#### **Donde:**

**i:** concentración

**γ<sub>i</sub>:** coeficiente de actividad

$$\log \gamma_i = -0.51 Z_i^2 \sqrt{I}$$

**I:** fuerza iónica

**S:** pendiente de la curva nerstiana

$$\underline{S} = 2,303 \frac{RT}{Z_i F}$$

**R:** constante de los gases (8.314 J/K·mol)

**T:** temperatura (298 K)

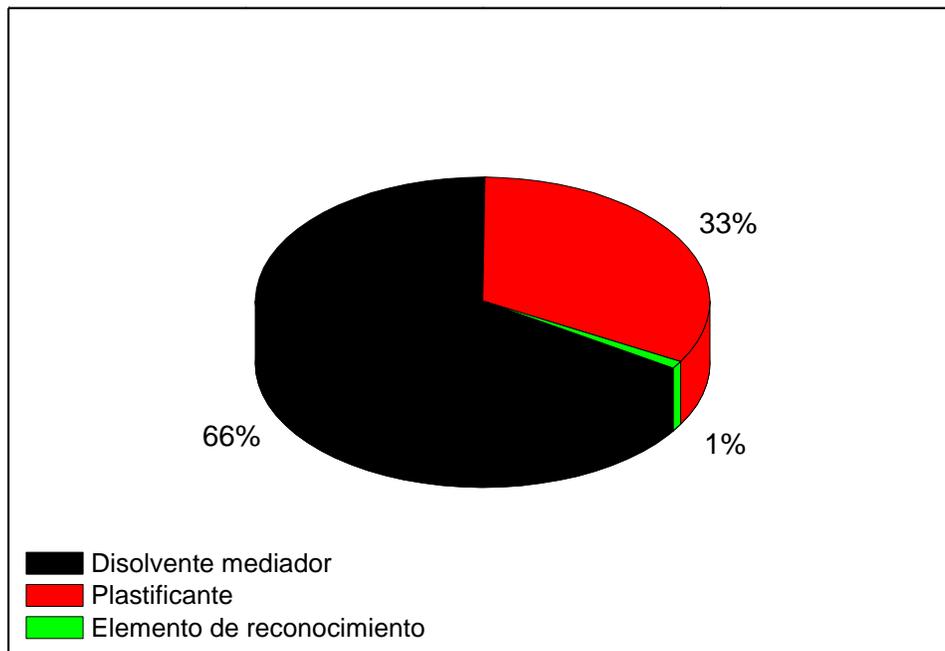
**F:** constante de Faraday (9,65·10<sup>4</sup> C/mol)

**Z<sub>i</sub>:** carga del ión

Los ESI han sido ampliamente utilizados en los últimos años y por lo que se ha desarrollado una gran variedad de los mismos, de los cuales los del tipo “all-solid-state” han venido desarrollándose cada vez más por su versatilidad <sup>54-55</sup>. Estos electrodos están constituidos, generalmente, por membranas líquidas que están formadas por una matriz polimérica, un disolvente mediador y el elemento de reconocimiento, siendo directamente depositadas sobre un material composite conductor. En este tipo

de electrodo se usa un contacto preparado básicamente con grafito o una mezcla de éste con resina epoxídica, en proporciones adecuadas.

Como se mencionó anteriormente, la fase sensora es la membrana líquida. En estos electrodos, la constituye una fase orgánica que actúa como barrera permeoselectiva, en la cual hay 3 componentes: la matriz polimérica (plastificante), el elemento de reconocimiento y el disolvente mediador. En el caso del disolvente mediador, se han estudiado diferentes tipos para determinar su influencia: entre ellos el 3-nitro-o-xileno (NOX), tributilfosfato (TBP), bis-(2-etilhexil) sebacato (DOS), tris-2-etilhexilfosfato (TEHP), dioctilftalato (DOP), dibutilftalato (DBP) tetradecil nitrato de amonio (TDAN) y o-nitrofeniloctil eter (o-NPOE), siendo este último el más empleado. Entre las funciones del disolvente mediador, está la modulación de la permeabilidad de la fase orgánica, además de ajustar la movilidad de los centros de coordinación de la membrana. Al mismo tiempo debe tener otras características como las de ser estable químicamente, presentar inercia química respecto a las formaciones del complejo receptor-sustrato, viscosidad y constante dieléctrica adecuadas <sup>56</sup>. De igual manera, la matriz (plastificante), también ha sido ampliamente estudiada. Un ejemplo de compuestos que se han empleado para este fin lo forman, polímeros, copolímeros (SBS) <sup>57</sup>, policloruro de vinilo (PVC), etc. El más universalmente empleado ha sido el PVC debido a sus características: ser estable e inerte al utilizar aditivos tales como estabilizantes, plastificantes entre otros puede transformarse en un material rígido o flexible; además es altamente resistente tiene elevada estabilidad mecánica y química <sup>56</sup>. Las propiedades de la membrana resultante dependen de la mezcla de ellos (Figura 3).

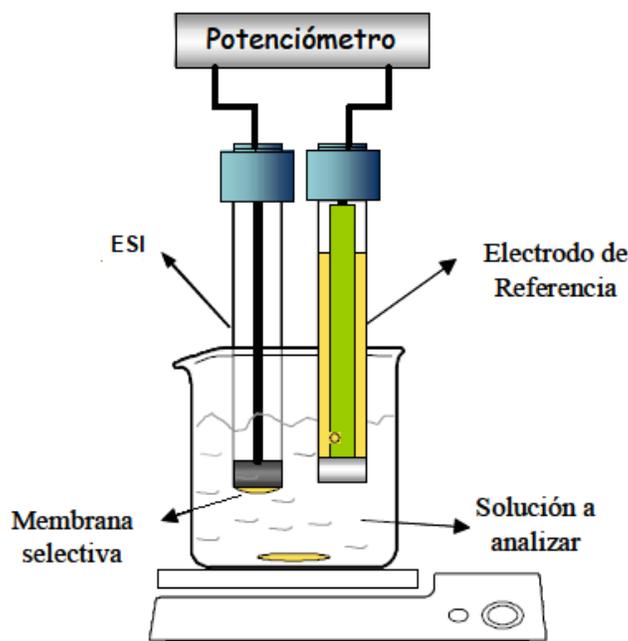


**Figura 3.** Típica distribución de componentes en una membrana polimérica de portador móvil

En el caso del elemento de reconocimiento, es al que se le atribuye la respuesta del electrodo, ya que es capaz de reconocer a una especie selectivamente. Se han empleado para este fin una gran variedad de receptores como: los éteres corona, las poliamidas y los PIM <sup>56-57</sup>. Los últimos (PIM) han cobrado relevancia debido a su versatilidad.

### 3.3.2 Mecanismo de trabajo de los ESI

Las mediciones potenciométricas con un sensor de estado sólido se realizan empleando una celda electroquímica de dos electrodos, un electrodo de referencia y un ESI. En la (Figura 4) se muestra un esquema típico para mediciones potenciométricas donde se puede considerar como dos medias celdas galvánicas representadas por el ESI, el electrodo de referencia <sup>58</sup>.



**Figura 4.** Montaje experimental para realizar las medidas potenciométricas empleando un ESI y un electrodo de referencia (Tomado de: Tesis Zine, 2004)

Existen distintos modelos para explicar el potencial generado en la interfase del electrodo como: los de equilibrio total (modelos clásicos), de equilibrio local (modelos de capa de difusión) y modelos avanzados de no equilibrio. En nuestro caso solo tendremos en cuenta el modelo de potencial de límite de fase (modelo clásico) <sup>59</sup>. Una suposición que se puede hacer es inferir que la mayoría de las contribuciones de los potenciales dependen de la muestra y por tanto la expresión de la fem ( $E$ ) se puede plantear de esta forma:

**Ecuación 2:**

$$E = E_{memb} + E_{liq} + E_{const}$$

**Donde:**

$E_{memb}$ : es el potencial de membrana

$E_{liq}$ : es el potencial de unión líquida del electrodo de referencia

$E_{const}$ : puede describirse como la suma de todas las contribuciones potenciales independientes de la muestra

El  $E_{liq}$  del electrodo de referencia, aparece debido a la tendencia de dos soluciones diferentes (electrodo de referencia interno | muestra) a mezclarse cuando se mantienen en contacto. Los cationes y aniones de una solución más altamente concentrada tienden a difundirse hacia la disolución menos concentrada para aumentar el equilibrio. Para evitar que las disoluciones se mezclen, se coloca un diafragma entre la interfase de la disolución muestra y la disolución de llenado interno del electrodo de referencia (pequeña pieza de cerámica o vidrio del electrodo, permeable a todas las especies, que evita que las soluciones se mezclen). Se crea una diferencia potencial debido a la separación de carga debido a diferentes movilidades iónicas. Los electrodos de referencia  $Ag^+/AgCl$  usan una sal altamente concentrada (KCl 3M) que tiene una movilidad iónica similar, dominando la transferencia de carga en la unión líquida. Esto mantiene el  $E_{liq}$  constante, minimizándolo de la ecuación 2 y haciendo que la fem sea independiente de ese potencial, este efecto también se puede lograr utilizando un puente salino.

El  $E_{memb}$  se considera entonces como la suma de tres componentes diferentes:

**Ecuación 3:**

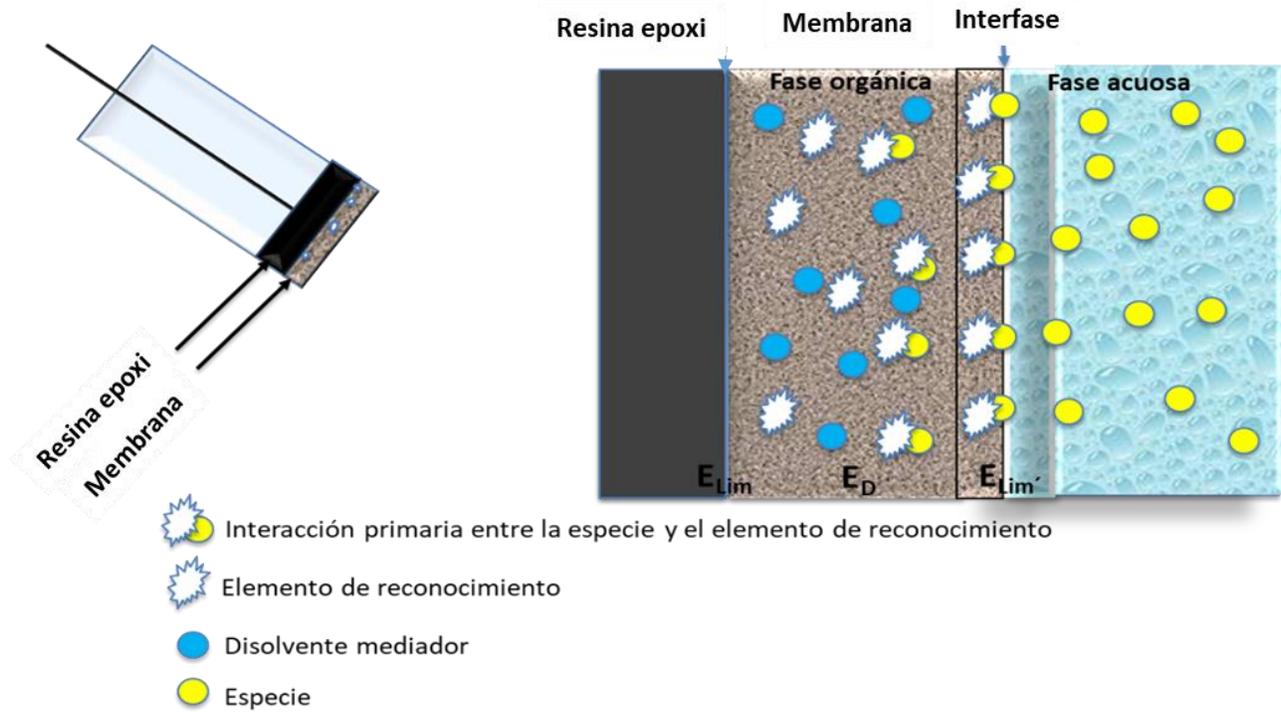
$$E_{memb} = E_{Lim} + E_D + E_{Lim'}$$

**Donde:**

$E_{Lim}$ : es el potencial límite entre el contacto sólido interno y la membrana

$E_D$ : es el potencial de difusión creado dentro de la membrana

$E_{Lim'}$ : es el potencial límite entre la membrana y la solución de muestra



**Figura 5.** Mecanismo de detección de límite de fase cuando la membrana se pone en contacto con una disolución acuosa que contiene la especie. Separación de carga en la membrana | interfase entre la membrana y la disolución que contiene la especie.

Deben considerarse diferentes supuestos en el modelo de potencial de límite de fase para simplificarlo:

I) El  $E_D$  creado dentro de la membrana puede despreciarse debido al hecho de que está relacionado con la cinética de especies cargadas en la membrana selectiva de iones

II)  $E_{Lim}$  se puede considerar como una constante porque comúnmente se considera independiente de la muestra, por lo que la ecuación 3 se simplifica a la ecuación 4 suponiendo que el potencial de membrana solo depende del potencial de límite de fase en la interfase de membrana | muestra.

III) Existe un equilibrio electroquímico en la interfase membrana (fase orgánica | muestra (fase acuosa))

**Ecuación 4:**

$$E_{memb} = E_{lim'}$$

Si siguiendo todos estos supuestos, la posible ecuación de Nernst puede describir el potencial de la celda en condiciones ideales:

$$E = \Delta\phi = \phi^{org} - \phi^{ac} = \frac{\mu_{i^{org}}^{\circ} - \mu_{i^{ac}}^{\circ}}{Z_i F} + \frac{RT}{Z_i F} \ln \frac{a_{i^{ac}}}{a_{i^{org}}}$$

**Donde:**

$\emptyset$ : es el potencial eléctrico

$Z_i$ : carga de la especie  $i$

$\mu_i$ : movilidad de las especies

$a_i$ : actividad de las especies

$R$ : constante de los gases (8.314 J/K·mol)

$T$ : temperatura (298 K)

$F$ : constante de Faraday ( $9,65 \cdot 10^4$  C/mol)

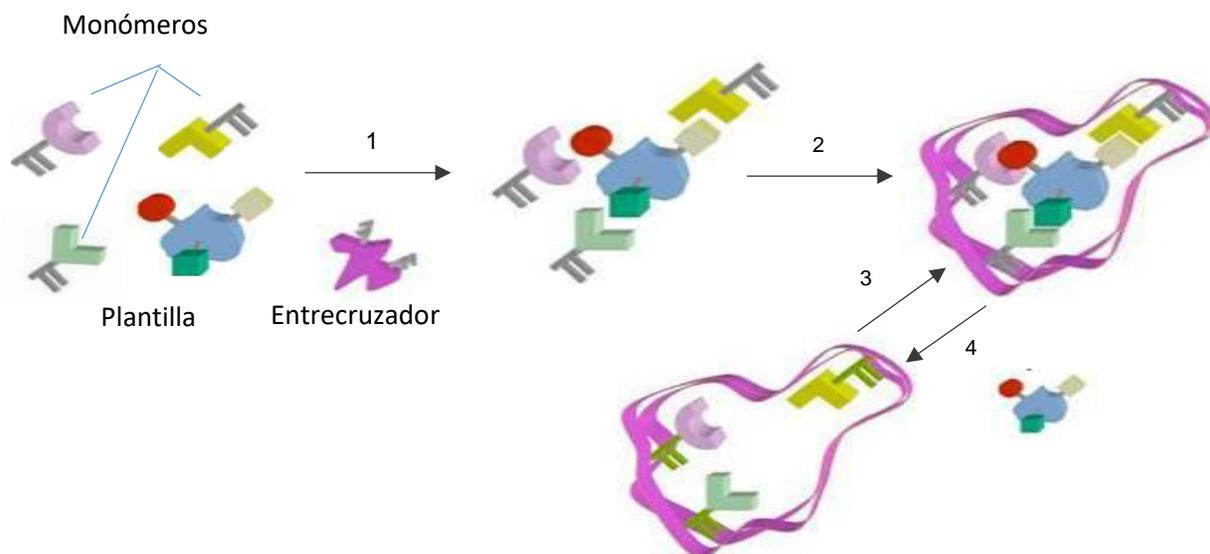
Debido a que el valor de  $a_i^{org}$  en la ecuación 5 permanece constante, lo que permite determinar el valor de  $a_i^{ac}$  y hacer que la concentración total de la especie en la membrana sea independiente de la muestra. La ecuación Nerst se puede simplificar:

**Ecuación 6:**

$$E = E_{const} + \frac{59.1}{Z_i} \ln a_i^{ac}$$

**3.4 Polímeros de impresión molecular**

El elemento de reconocimiento, constituye el componente de mayor importancia dentro de un sensor porque es el que tiene los grupos funcionales complementarios al analito. En los últimos años, se ha visto un marcado auge en el desarrollo nuevos sistemas de análisis en los cuales se emplean PIM como elemento de reconocimiento <sup>60</sup>. Los PIM, son sistemas sintéticos que se comportan como receptores biomiméticos, capaces de reconocer selectivamente, al analito para el cual se han preparado. Esta característica le confiere muchas ventajas entre las que se encuentran las de poderse sintetizar a diseño, su estabilidad, tanto química como física, ante las variaciones de las condiciones de trabajo como temperatura, pH y muestran un buen desempeño en presencia de algunos solventes orgánicos, adicionalmente se pueden obtener en forma de esferas, laminas y sobre centros comúnmente llamados core@shell. Los PIMs se pueden obtener de forma sencilla a partir de monómeros orgánicos e inorgánicos un entrecruzador, un disolvente (porógeno), el iniciador y el analito a determinar (Figura 6).



**Figura 6.** Representación esquemática del proceso de impronta molecular. (1) Formación de un complejo entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales, (2) polimerización, (3) extracción de la plantilla, (4) reconocimiento selectivo. (Tomado de: Tesis Orellana, 2016)

Ha habido varios intentos de detectar el CaP, mediante la determinación simultánea de varios biomarcadores del cáncer en suero, orina o tejido <sup>12, 61</sup>.

Sin embargo, los principales problemas de estos dispositivos son que utilizan un elemento biológico y un marcador (fluorescente, electrométrico, etc.) para mejorar la sensibilidad del sistema lo cual aumenta la complejidad de la prueba, así como su costo. Estos dispositivos, no tienen un mecanismo de ajuste que permita la adaptación del mismo para diferentes aplicaciones. En este sentido, el empleo de sensores potenciométricos que emplean PIMs como elemento de reconocimiento, podrían ser una alternativa para la detección de CaP, con elevada selectividad, sensibilidad y bajo costo. Este es el caso del grupo de Rebelo *et. al.* <sup>62-63</sup> que desarrollaron un biosensor potenciométrico para la detección de PSA empleando como portador móvil un PIMs para determinar PSA en suero humano. Para llevar a cabo la síntesis del PIM, en primer lugar, inmovilizan el PSA sobre grafeno y posteriormente sintetizan el polímero sobre la proteína, por último extraen la molécula plantilla para la posterior detección selectiva del analito. Aunque se obtienen resultados similares (2-89 ng/mL) a los de los ensayos ELISA comerciales (0.2-60 ng/mL), solo se han aplicado a la detección de PSA en diferentes líneas celulares (muestra sintética, mezcla de antígenos con estructuras similares al PSA). Este grupo

también desarrolló un sensor para la cuantificación de sarcosina mediante detección electroquímica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (a 0,6 V) generada a partir de la oxidación catalizada de sarcosina; se llevó a cabo después de la modificación de los electrodos, mediante la inmovilización de la sarcosina oxidasa (elemento de reconocimiento) sobre la superficie del electrodo. El grupo de Ebru Birlik *et. al.*<sup>41</sup> ha desarrollado y evaluado un sensor potenciométrico empleando PIMs como elemento de reconocimiento selectivo a sarcosina, mostrando una alta selectividad, un tiempo de respuesta menor a 2 min, un intervalo lineal de ( $10^{-2}$  - $10^{-6}$  mM), un límite de detección ( $1.35 \cdot 10^{-7}$  mM) y una estabilidad de aproximadamente 5.5 meses.

Por otra parte, los PIM obtenidos se deben caracterizar analíticamente y para ello se evalúa la interacción de la molécula plantilla con el polímero obtenido. Actualmente se usan diferentes técnicas para este fin como Espectroscopia de Ultravioleta Visible (UV-VIS), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR con detección UV-VIS), Cromatografía Gaseosa Acoplada Espectrometría de Masa (GC-MS) y técnicas electroquímicas entre otras. En este trabajo, para evaluar estas propiedades de reconocimiento de PIM sintetizados hacia el biomarcadores, se realizó mediante técnicas cromatográficas acopladas a masas. Estas técnicas análisis son ampliamente empleadas por las ventajas que ofrecen, como la alta sensibilidad, robustez y reproducibilidad.

### **3.5 Estudio de la interacción monómero plantilla**

Uno de los retos en la química moderna es tratar de realizar experimentos complejos sin que esto requiera ocupar mucho tiempo. Debido a esto la comunidad científica se dio a la tarea hace algunas décadas de emplear la tecnología en función de crear modelos que ayudaran a realizar experimentación, pero sin estar en el laboratorio. Por lo tanto, se comenzó a diseñar moléculas en computadoras y de ahí a predecir propiedades químicas de los compuestos. La química computacional comenzó a rivalizar con las determinaciones experimentales<sup>64-65</sup>.

La química computacional es una rama de la química teórica y de la química cuántica. El objetivo de esta disciplina es producir y utilizar programas informáticos para el estudio de las propiedades (como energía, momento dipolar, frecuencias de vibración) de las moléculas. Los químicos computacionales usan los programas existentes y los aplican a problemas químicos específicos.

Los programas usados en química computacional se basan en diferentes métodos mecanocuánticos que resuelven la ecuación de Schrödinger molecular. Estos métodos incluyen distintos parámetros para desarrollar estas ecuaciones. Los métodos que no incluyen parámetros empíricos ni semi-

empíricos en sus ecuaciones se llaman métodos ab initio (desde el inicio). Los métodos ab initio es el nombre que reciben los métodos computacionales que son directamente derivados de principios teóricos, sin tener en cuenta datos experimentales. Las clases más populares de métodos ab initio son: Hartree-Fock, semiempíricos y teoría del funcional de la densidad (DFT). En el caso de este último (DFT) aún está en discusión si ha de considerarse ab initio o semiempírico. Cada clase contiene diversos métodos que usan diferentes variantes de la teoría, típicamente orientados a una propiedad molecular concreta, o a un conjunto especial de moléculas. La abundancia de estos métodos en es una prueba de que no hay un método único que sea adecuado para todos los propósitos.<sup>64</sup>

En la actualidad existe cierta polémica sobre si los métodos empleados en la química computacional son suficientemente precisos como para describir adecuadamente reacciones químicas complejas, sin embargo, hay que reconocer que el empleo de estos programas contribuye a predecir con un acercamiento a la realidad lo que se realiza en el laboratorio a nivel experimental.

Existe un gran número de paquetes informáticos disponibles autosuficientes para la simulación de reacciones e interacciones entre compuestos. Entre los más usados se encuentran los siguientes: GAMESS<sup>66-67</sup>, Q-Chem<sup>68-69</sup>, MOLCAS<sup>70-71</sup>, ACES<sup>72</sup>, MOLPRO<sup>73</sup>, Spartan<sup>74</sup> y Gaussian. Este último es de los más empleados para el estudio de las interacciones y el cálculo de las energías de enlace para la toma de decisiones en reacciones complejas, sobre todo en interacciones monómero plantilla para la obtención de PIMs<sup>75-78</sup>.

El programa Gaussian emplea el Gaussian type orbital (GTO) para los cálculos que se realizan y DFT para obtener energías y densidades del estado fundamental mediante una funcional de intercambio-correlación de la cual se desconoce su valor exacto por lo que se realizan aproximaciones. Por esta razón se formulan funcionales aproximados (híbridos) que pueden diferenciar los efectos locales y otros que incluyen correcciones del gradiente de la densidad como el: APFD, MPW1PW91 y el B3LYP (las iniciales de estos métodos corresponden al nombre del creador)<sup>79</sup>.

Los métodos como el DFT emplean conjuntos de base para describir matemáticamente los orbitales de un sistema químico. La elección de la base de cálculo es de suma importancia ya que de ello dependen los resultados finales. Conjuntos de bases pequeñas se traduce en resultados poco precisos y de bases grandes constituyen una aproximación más exacta de los orbitales por lo que se obtienen cálculos más precisos de los electrones en el espacio. Los conjuntos de base estándar son combinaciones de funciones gaussianas<sup>64, 66</sup>. En el Gaussian además de elegir el método para la simulación también se eligen conjuntos de base (emplea una combinación de conjuntos de base) entre

las que se encuentran: bases de valencia, base extendida (split valence, base polarizada y funciones difusas). Una de las combinaciones que se emplea es utilizar el método DFT, función híbrida (B3LyP) y conjuntos de base split valence (doble zeta) 6-31G, polarizada 6-31G (d, p) y difusas 6-31+G.

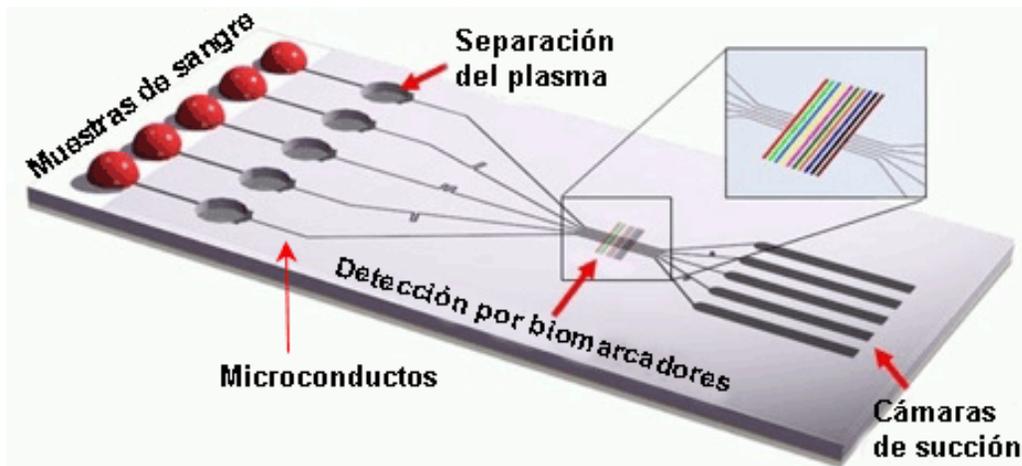
El software Gaussian utiliza una interfaz Gaussview en la cual ingresando los datos se puede construir moléculas de manera visual, introduciendo la estructura de la molécula y demás comandos que contienen la información para modelar. Una vez ingresados los datos Gaussian realiza los cálculos.

Por último, cabe destacar que la modelización molecular de las interacciones entre el monómero y la molécula molde en PIMs permite evaluar un número elevado de posibles polímeros impresos, sin tener que sintetizarlos en el laboratorio. Como fue mencionado anteriormente, mediante la simulación computacional se puede estudiar la fuerza de los enlaces que se formarían entre el analito plantilla y los monómeros simulando las diferentes condiciones experimentales empleadas durante la polimerización. De esta forma, es posible predecir el comportamiento de los diferentes polímeros propuestos, sintetizándose únicamente aquellos para los que el resultado obtenido nos refiere un enlace lo suficientemente fuerte que garantice en algún modo la estabilidad de la impresión esto se traduce en una energía de enlace baja. La comparación de los resultados obtenidos experimentalmente con los predichos a partir del modelo de modelización molecular es generalmente satisfactoria <sup>80</sup>.

### **3.6 Tecnología Lab-on-a-chip**

En los últimos años, los avances en las tecnologías de micromaquinado y microfabricación han permitido la creación de dispositivos en escala micrométrica y nanométrica. Desde que Manz <sup>81</sup> y su grupo de trabajo desarrollaron el concepto de sistema de análisis total miniaturizado ( $\mu$ TAS, por su siglas en inglés) o Lab-on-a-Chip (LOC), la miniaturización de dispositivos biológicos, químicos y electroquímicos ha acaparado enormemente la atención debido a que se han obtenido grandes avances en este campo <sup>82-83</sup>. Un dispositivo LOC integra los componentes esenciales y funcionalidades de un laboratorio en un pequeño chip que realiza un análisis específico de naturaleza biológica o química, incluyendo transporte, reacción o detección o una generación de señal cuantificable.

Una de las aplicaciones más importantes de las plataformas microfluídicas bajo tecnología LOC es en la biomedicina, sobre todo en el diagnóstico de enfermedades. Las principales ventajas que aportan los dispositivos LOC <sup>46</sup>, radican en la realización de medidas en continuo y en tiempo real de volúmenes de muestra muy pequeños para la determinación de analitos de interés clínico como los biomarcadores de cáncer y otros patógenos peligrosos (Figura 7).



**Figura 7.** Sistema microfluídico con tecnología LOC (Tomada de: Lab Chip, 2011,11, 845-850)

Debido a que las e-Ts y los sensores potenciométricos basados en PIMs, incorporados a sistemas LOC, constituyen una opción atractiva para la detección simultánea de varios analitos se han encontrado trabajos que incorporan estas ventajas para la detección de analitos que afectan la salud humana y en la detección de biomarcadores de CaP. Este es el caso del grupo de Dan Xu *et. al.* <sup>60</sup> que han miniaturizado sensores y ubicado en microcanales de electrodos interdigitados una capa fina polimérica de polianilina (cátodo) y 3,4 etilendioxitiofeno-poliestireno sulfonato, polipirrol (ánodo) para la determinación de trazas de contaminantes tóxicos, (atrazina, bisfenol A) en aguas. La medición se basa en el sensado diferencial de 6 analitos y se analiza la respuesta mediante análisis de componentes principales. También se han desarrollado dispositivos LOC para la detección del CaP en el cual combinan la detección de dos biomarcadores (PSA y SPONDIN2) mediante un sistema tipo ELISA inmovilizados sobre electrodos de oro y detección voltamperométrica <sup>84</sup>. El sensor resulta adecuado para medir valores de estos marcadores tumorales entre 1-10 ng/mL, pero incluye varios pasos de reacción empleando biomoléculas (como los anticuerpos del PSA y del SPONDIN-2) y la unión al anticuerpo antígeno es muy fuerte, convirtiendo el método en irreversible y de un solo uso.

Aunque el estado del arte de estos desarrollos es muy amplio, no se encontraron reportes en la literatura consultada de PIMs acoplados a electrodos potenciométricos en plataformas microfluídicas, bajo tecnología LOC para la detección diferencial de más de un biomarcador de CaP.

### **3.7 Justificación**

La detección actual del CaP basada en la determinación del PSA es insuficiente para la determinación de la existencia o no de la enfermedad. Esta debe ser confirmada a través de otras evaluaciones a los pacientes como del DRE y la biopsia, los cuales resultan en métodos invasivo y con diferentes complicaciones físicas y psicológicas para el paciente.

Existe la necesidad inmediata, de tener en cuenta otros analitos complementarios capaces de proporcionar una información de mayor sensibilidad y especificidad para la determinación de la presencia de la enfermedad y fase de aparición. La detección selectiva de analitos como la sarcosina mediante sensores potenciométricos; permiten vislumbrar un sistema de análisis sensible, específico, con tiempos de respuesta rápidos y automatizados.

**Estas páginas fueron eliminadas debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2017, y con el Artículo 116 de la Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2015.**

## 7 Conclusiones

1. El estudio de las características estructurales, naturaleza, la matriz a analizar y la etapa en que aparece el biomarcador permitieron seleccionar a la sarcosina, como el biomarcador prioritario.
2. Mediante estudios teóricos por química computacional fue posible seleccionar al MAA, en relación 4:1 respecto a sarcosina, como el monómero funcional de mejor interacción para la síntesis de los PIM
3. Los PIM desarrollados empleando MAA como monómero funcional en las condiciones del trabajo, permitieron la obtención de materiales de reconocimiento altamente sensibles y selectivos para la sarcosina
4. La caracterización de los PIMs por BET, permitió corroborar que los materiales obtenidos corresponden sólidos micro y mesoporosos, con tamaños de poro y área superficial adecuados para su empleo en sensores potenciométricos.
5. El estudio del tamaño de partícula del PIM empleado en la membrana permitió establecer que los sensores obtenidos con tamaños de partículas menores a  $38 \mu\text{m}$  presentan mejor sensibilidad e intervalo lineal de trabajo que los obtenidos con tamaños de partículas mayores.
6. Para los estudios de reenlace de los materiales sintetizados fue necesario desarrollar y optimizar una metodología analítica mediante UPLC-MS, en modo isocrático capaz de determinar el analítico en concentraciones inferiores a  $10^{-5}$  M.
7. El electrodo que utiliza tamaño de partícula menor de  $15 \mu\text{m}$  y 6 % del PIM en membrana, exhibe una sensibilidad  $-23.7$  de mV/dec, con LD de  $2 \cdot 10^{-8}$  mol/L, LD lo cual lo hace adecuado para la determinación de sarcosina en muestras de orina ( $9 \cdot 10^{-7}$  -  $2.22 \cdot 10^{-5}$  mol/L), con un tiempo de respuesta de 30 s.
8. El estudio de selectividad mostró que los sensores desarrollados presentan una alta selectividad a sarcosina en presencia de las especies estudiadas (ácido úrico, biotina, histidina, glicina), a excepción de la creatinina con un KA,B Pot (0.2).

## Perspectivas

- ❖ Desarrollar polímeros de impresión molecular no selectivos para sensado diferencial de diferentes biomarcadores complementarios de CaP (hk2, PSA libre, prolina, ácido kinurénico) complementarios
- ❖ Llevar sensores diferenciales a plataforma microfluídica
- ❖ Integrar métodos de análisis multivariado para la correcta discriminación de señales de los diversos biomarcadores para conformar una lengua electrónica microfluídica

## Anexo 1

Sensor: PIM 2 %, 4 %, 6 %

Electrodo de referencia: Ag /AgCl

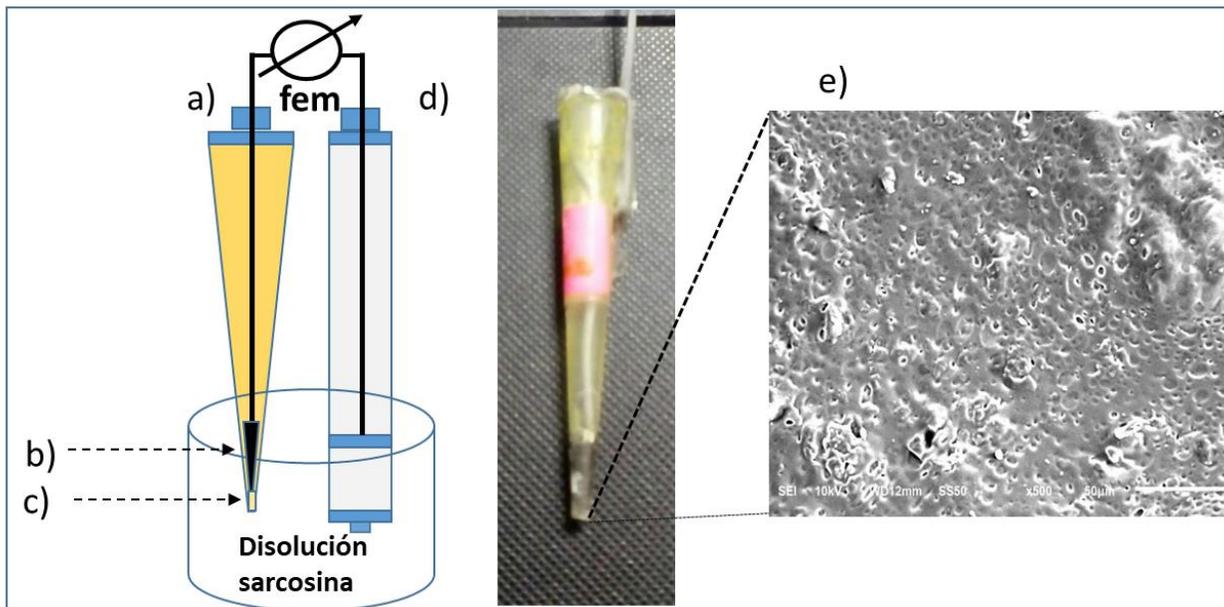
Disolución: sarcosina

### 1- Hoja de trabajo empleada para calibración de los electrodos

Conc patrón Sarcosina	Vol (µl)	Conc final sarcosina	Log C	E (mV)
10 <sup>-5</sup>	10	8·10 <sup>-8</sup>	-7.09791	
	25	1.79·10 <sup>-7</sup>	-6.74864	
	50	3.77·10 <sup>-7</sup>	-6.42583	
	50	5.74·10 <sup>-7</sup>	-6.24376	
	50	7.71·10 <sup>-7</sup>	-6.11604	
10 <sup>-4</sup>	25	1.76·10 <sup>-6</sup>	-5.75916	
	25	2.74·10 <sup>-6</sup>	-5.56808	
	50	4.74·10 <sup>-6</sup>	-5.33462	
	50	6.66·10 <sup>-6</sup>	-5.1856	
10 <sup>-3</sup>	10	1.06·10 <sup>-5</sup>	-4.98613	
	25	2.19·10 <sup>-5</sup>	-4.7062	
	25	3.02·10 <sup>-5</sup>	-4.53923	
	25	3.99·10 <sup>-5</sup>	-4.4211	
	50	5.94·10 <sup>-5</sup>	-4.25308	
	50	7.88·10 <sup>-5</sup>	-4.13436	
	50	9.81·10 <sup>-5</sup>	-4.04104	

$10^{-2}$	25	$1.95 \cdot 10^{-4}$	-3.75814	
	25	$2.92 \cdot 10^{-4}$	-3.59325	
	50	$4.86 \cdot 10^{-4}$	-3.38839	
	50	$6.78 \cdot 10^{-4}$	-3.25679	
	50	$8.68 \cdot 10^{-4}$	-3.16052	
	50	$1.06 \cdot 10^{-3}$	-3.08358	

## 2- Sensor potenciométrico empleado para la detección de sarcosina



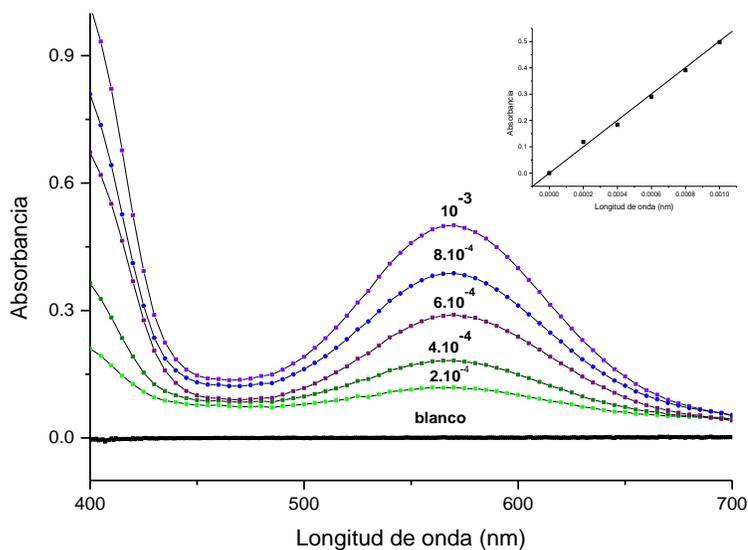
Electrodo selectivo (ES) b) composite epoxiconductor c) membrana líquida d) electrodo de referencia Ag/AgCl e) micrografía de la membrana líquida con 24 h de activación

## Anexo 2

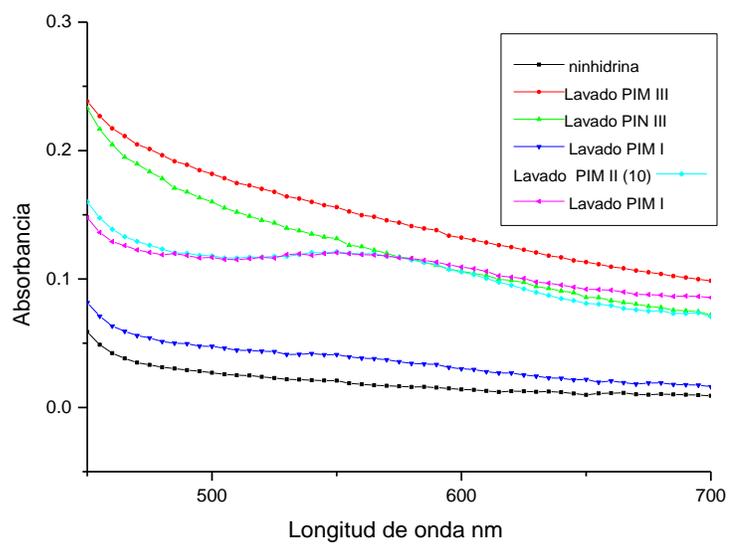
### Estudios realizados en la Universidad Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Estancia becas mixtas

- Síntesis de PIM core Shell sobre partículas comerciales y nanopartículas de SiO<sub>2</sub>
  - Estudios de reenlace con metodología ninhidrina
- 1- Determinación de sarcosina con ninhidrina:** A 5 ml de una disolución que contiene 0.2 mg de sarcosina se le agrega 2 mL de una disolución preparada de ninhidrina (2 % m/v) en acetona. Para que ocurra la reacción de derivatización esta disolución debe ser calentada en un baño por 10 min hasta aparecer el color rosa. Después de fría se mide la concentración de sarcosina a 570 nm. Se prepara un blanco bajo las mismas condiciones de la muestra.

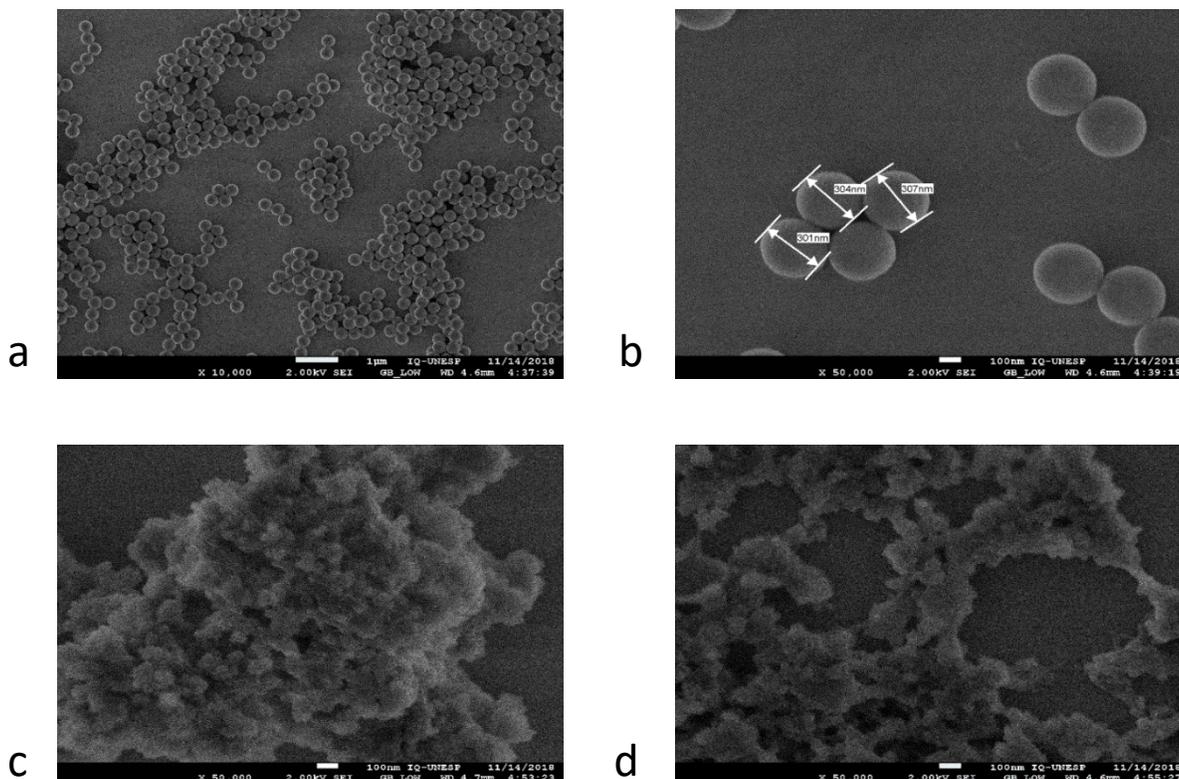
#### 1.1 Curva de calibración



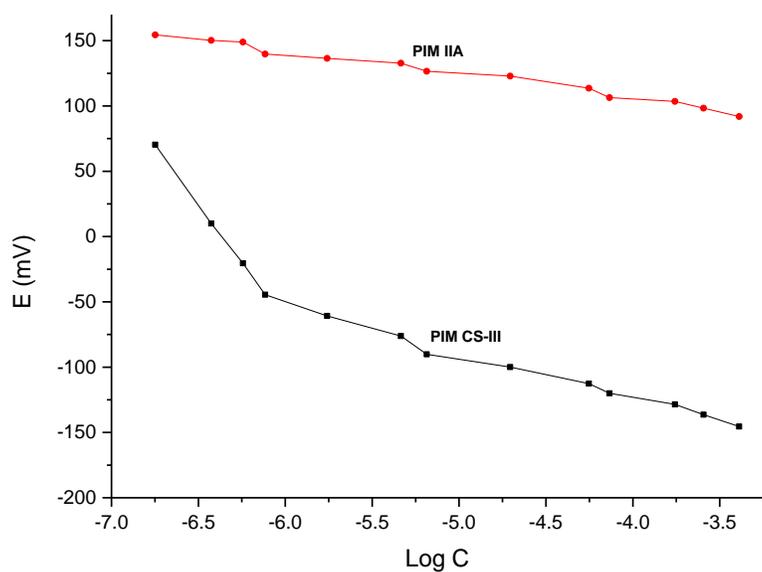
## 1.2 Lavados polímeros



1.3 Micrografías de a) Partículas de SiO<sub>2</sub>@MPS, b) Tamaño de partículas (nanopartículas de SiO<sub>2</sub>@MPS) c) PIN-CS III d) PIM-CS III



1.4 Comparación sensor con PIM II A y PIM-CS III



## 8 Referencias bibliográficas

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **2018**, *68* (6), 394-424.
2. Dean, M.; Lou, H., Genetics and genomics of prostate cancer. *Asian J Androl* **2013**, *15* (3), 309-313.
3. Fong, M. K.; Hare, R.; Jarkowski, A., A new era for castrate resistant prostate cancer: a treatment review and update. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* **2012**, *18* (3), 343-354.
4. Loberg, R. D.; Logothetis, C. J.; Keller, E. T.; Pienta, K. J., Pathogenesis and treatment of prostate cancer bone metastases: targeting the lethal phenotype. *Journal of Clinical Oncology* **2005**, *23* (32), 8232-8241.
5. <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata>.
6. GLOBOCAN, D. d. I. A. I. d. I. s. C. <http://www.uicc.org/resources/globocan>.
7. Andriole, G. L.; Crawford, E. D.; Grubb III, R. L.; Buys, S. S.; Chia, D.; Church, T. R.; Fouad, M. N.; Gelmann, E. P.; Kvale, P. A.; Reding, D. J., Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *New England Journal of Medicine* **2009**, *360* (13), 1310-1319.
8. Lilja, H., Testing new PSA subforms to enhance the accuracy of predicting cancer risk and disease outcome in prostate cancer. *Clinical chemistry* **2008**, *54* (7), 1248-1249.
9. Christian, R.; Juan, F. O.; Alejandro, M. C., Detección precoz de cáncer de próstata: Controversias y recomendaciones actuales. *Revista Médica Clínica Las Condes* **2018**, *29* (2), 128-135.
10. PROSTÁTICO, M. D. E. E. C. *Dr. Adolfo García*; Hospital Hermanos Amejeiras: 2008.
11. Lucarelli, G.; Rutigliano, M.; Bettocchi, C.; Palazzo, S.; Vavallo, A.; Galleggiante, V.; Trabucco, S.; Di Clemente, D.; Selvaggi, F. P.; Battaglia, M., Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel diagnostic biomarker for prostate cancer. *The Journal of urology* **2013**, *190* (6), 2271-2277.
12. Liu, N.; Liang, W.; Ma, X.; Li, X.; Ning, B.; Cheng, C.; Ou, G.; Wang, B.; Zhang, J.; Gao, Z., Simultaneous and combined detection of multiple tumor biomarkers for prostate cancer in human serum by suspension array technology. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *47*, 92-98.
13. Saini, S., PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cellular Oncology* **2016**, 1-10.
14. Albitar, M.; Ma, W.; Lund, L.; Albitar, F.; Diep, K.; Fritsche, H. A.; Shore, N., Predicting Prostate Biopsy Results Using a Panel of Plasma and Urine Biomarkers Combined in a Scoring System. *Journal of Cancer* **2016**, *7* (3), 297.
15. Balk, S. P.; Ko, Y.-J.; Bubley, G. J., Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology* **2003**, *21* (2), 383-391.
16. Sreekumar, A.; Poisson, L. M.; Rajendiran, T. M.; Khan, A. P.; Cao, Q.; Yu, J.; Laxman, B.; Mehra, R.; Lonigro, R. J.; Li, Y., Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* **2009**, *457* (7231), 910-914.
17. Bensalah, K.; Lotan, Y.; Karam, J.; Shariat, S., New circulating biomarkers for prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases* **2008**, *11* (2), 112-120.
18. Bickers, B.; Aukim-Hastie, C., New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer-the post PSA era. *Anticancer research* **2009**, *29* (8), 3289-3298.
19. Prensner, J. R.; Rubin, M. A.; Wei, J. T.; Chinnaiyan, A. M., Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Science translational medicine* **2012**, *4* (127), 127rv3-127rv3.

20. Bussemakers, M. J.; van Bokhoven, A.; Verhaegh, G. W.; Smit, F. P.; Karthaus, H. F.; Schalken, J. A.; Debruyne, F. M.; Ru, N.; Isaacs, W. B., DD3: A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer research* **1999**, *59* (23), 5975-5979.
21. Tosoian, J. J.; Ross, A. E.; Sokoll, L. J.; Partin, A. W.; Pavlovich, C. P., Urinary biomarkers for prostate cancer. *Urologic Clinics of North America* **2016**, *43* (1), 17-38.
22. Cernei, N.; Heger, Z.; Gumulec, J.; Zitka, O.; Masarik, M.; Babula, P.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Kizek, R.; Adam, V., Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker—a review. *International journal of molecular sciences* **2013**, *14* (7), 13893-13908.
23. Struys, E. A.; Heijboer, A. C.; van Moorselaar, J.; Jakobs, C.; Blankenstein, M. A., Serum sarcosine is not a marker for prostate cancer. *Annals of clinical biochemistry* **2010**, *47* (3), 282-282.
24. Issaq, H. J.; Veenstra, T. D., Is sarcosine a biomarker for prostate cancer? *Journal of separation science* **2011**, *34* (24), 3619-3621.
25. Alapont Alacreu, J. M.; Navarro Rosales, S.; Budía Alba, A.; España Furió, F.; Morera Martínez, F.; Jiménez Cruz, J. F., PSA y hK2 en el diagnóstico de cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas* **2008**, *32*, 575-588.
26. Tremblay, R. R.; Deperthes, D.; Tetu, B.; Dube, J. Y., Immunohistochemical study suggesting a complementary role of kallikreins hK2 and hK3 (prostate-specific antigen) in the functional analysis of human prostate tumors. *The American journal of pathology* **1997**, *150* (2), 455.
27. Salami, S. S.; Schmidt, F.; Laxman, B.; Regan, M. M.; Rickman, D. S.; Scherr, D.; Bueti, G.; Siddiqui, J.; Tomlins, S. A.; Wei, J. T.; Chinnaiyan, A. M.; Rubin, M. A.; Sanda, M. G., Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **31** (5), 566-571.
28. Laxman, B.; Morris, D. S.; Yu, J.; Siddiqui, J.; Cao, J.; Mehra, R.; Lonigro, R. J.; Tsodikov, A.; Wei, J. T.; Tomlins, S. A.; Chinnaiyan, A. M., A First-Generation Multiplex Biomarker Analysis of Urine for the Early Detection of Prostate Cancer. *Cancer Research* **2008**, *68* (3), 645-649.
29. Xie, C.; Kim, H. J.; Haw, J. G.; Kalbasi, A.; Gardner, B. K.; Li, G.; Rao, J.; Chia, D.; Liang, M.; Punzalan, R. R., A novel multiplex assay combining autoantibodies plus PSA has potential implications for classification of prostate cancer from non-malignant cases. *Journal of translational medicine* **2011**, *9* (1), 43.
30. Zheng, G.; Patolsky, F.; Cui, Y.; Wang, W. U.; Lieber, C. M., Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat Biotech* **2005**, *23* (10), 1294-1301.
31. Ferro, M.; Lucarelli, G.; Bruzzese, D.; Perdona, S.; Mazzarella, C.; Perruolo, G.; Marino, A.; Cosimato, V.; Giorgio, E.; Tagliamonte, V., Improving the prediction of pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy: the value of prostate cancer antigen 3 (PCA3), prostate health index (phi) and sarcosine. *Anticancer research* **2015**, *35* (2), 1017-1023.
32. Khan, A. P.; Rajendiran, T. M.; Bushra, A.; Asangani, I. A.; Athanikar, J. N.; Yocum, A. K.; Mehra, R.; Siddiqui, J.; Palapattu, G.; Wei, J. T.; Michailidis, G.; Sreekumar, A.; Chinnaiyan, A. M., The Role of Sarcosine Metabolism in Prostate Cancer Progression. *Neoplasia* **2013**, *15* (5), 491-IN13.
33. Gkotsos, G.; Virgiliou, C.; Lagoudaki, I.; Sardeli, C.; Raikos, N.; Theodoridis, G.; Dimitriadis, G., The Role of Sarcosine, Uracil, and Kynurenic Acid Metabolism in Urine for Diagnosis and Progression Monitoring of Prostate Cancer. *Metabolites* **2017**, *7* (1), 9.
34. Yamkamon, V.; Phakdee, B.; Yainoy, S.; Suksrichawalit, T.; Tatanandana, T.; Sangkum, P.; Eiamphungporn, W., Development of sarcosine quantification in urine based on enzyme-coupled colorimetric method for prostate cancer diagnosis. *EXCLI journal* **2018**, *17*, 467.

35. Rebelo, T. S.; Pereira, C. M.; Sales, M. G. F.; Noronha, J. P.; Costa-Rodrigues, J.; Silva, F.; Fernandes, M., Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples. *Analytica chimica acta* **2014**, *850*, 26-32.
36. Chung, T.-C.; Li, C.-T.; Kou, H.-S.; Wu, H.-L., High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Sarcosine as a Fluorescent Levofloxacin Derivative. *Journal of Chromatographic Science* **2015**.
37. Wu, H.; Liu, T.; Ma, C.; Xue, R.; Deng, C.; Zeng, H.; Shen, X., GC/MS-based metabolomic approach to validate the role of urinary sarcosine and target biomarkers for human prostate cancer by microwave-assisted derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *401* (2), 635-646.
38. Jiang, Y.; Cheng, X.; Wang, C.; Ma, Y., Quantitative determination of sarcosine and related compounds in urinary samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2010**, *82* (21), 9022-9027.
39. Narwal, V.; Kumar, P.; Joon, P.; Pundir, C. S., Fabrication of an amperometric sarcosine biosensor based on sarcosine oxidase/chitosan/CuNPs/c-MWCNT/Au electrode for detection of prostate cancer. *Enzyme and Microbial Technology* **2018**, *113*, 44-51.
40. Nguy, T. P.; Van Phi, T.; Tram, D. T.; Eersels, K.; Wagner, P.; Lien, T. T., Development of an impedimetric sensor for the label-free detection of the amino acid sarcosine with molecularly imprinted polymer receptors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *246*, 461-470.
41. Özkütük, E. B.; Diltemiz, S. E.; Avcı, Ş.; Uğurağ, D.; Aykanat, R. B.; Ersöz, A.; Say, R., Potentiometric sensor fabrication having 2D sarcosine memories and analytical features. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *69*, 231-235.
42. Kimmel, D. W.; LeBlanc, G.; Meschievitz, M. E.; Cliffel, D. E., Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (2), 685-707.
43. Mimendia, A.; Gutiérrez, J. M.; Leija, L.; Hernández, P. R.; Favari, L.; Muñoz, R.; Del Valle, M., A review of the use of the potentiometric electronic tongue in the monitoring of environmental systems. *Environmental Modelling & Software* **2010**, *25* (9), 1023-1030.
44. Vlasov, Y.; Legin, A.; Rudnitskaya, A.; Di Natale, C.; D'amico, A., Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2005**, *77* (11), 1965-1983.
45. Ciosek, P.; Wesoly, M.; Zabadaj, M.; Lisiecka, J.; Sołohub, K.; Cal, K.; Wróblewski, W., Towards flow-through/flow injection electronic tongue for the analysis of pharmaceuticals. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *207*, 1087-1094.
46. Daikuzono, C. M.; Dantas, C. A.; Volpati, D.; Constantino, C. J.; Piazzetta, M. H.; Gobbi, A. L.; Taylor, D. M.; Oliveira, O. N.; Riul, A., Microfluidic electronic tongue. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *207*, 1129-1135.
47. Roine, A.; Veskimäe, E.; Tuokko, A.; Kumpulainen, P.; Koskimäki, J.; Keinänen, T. A.; Häkkinen, M. R.; Vepsäläinen, J.; Paavonen, T.; Lekkala, J., Detection of prostate cancer by an electronic nose: a proof of principle study. *The Journal of urology* **2014**, *192* (1), 230-235.
48. Pascual, L.; Campos, I.; Vivancos, J.-L.; Quintás, G.; Loras, A.; Martínez-Bisbal, M. C.; Martínez-Mañez, R.; Boronat, F.; Ruiz-Cerdà, J. L., Detection of prostate cancer using a voltammetric electronic tongue. *Analyst* **2016**, *141* (15), 4562-4567.
49. Solovieva, S.; Karnaukh, M.; Panchuk, V.; Andreev, E.; Kartsova, L.; Bessonova, E.; Legin, A.; Wang, P.; Wan, H.; Jahatspanian, I., Potentiometric multisensor system as a possible simple tool for non-invasive prostate cancer diagnostics through urine analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**, *289*, 42-47.

50. Kamel, A. H.; Coelho Moreira, F. T.; Rebelo, T. S. R.; Sales, M. G. F., Molecularly-imprinted materials for potentiometric transduction: Application to the antibiotic enrofloxacin. *Analytical Letters* **2011**, *44* (12), 2107-2123.
51. Ammann, D., *Ion-selective microelectrodes: principles, design and application*. Springer Science & Business Media: 2013; Vol. 50.
52. Alegret, S.; Del Valle, M.; Merkoci, A., *Sensores electroquímicos*, ed. 2004.
53. Buck, R. P.; Lindner, E., Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry* **1994**, *66* (12), 2527-2536.
54. Lazo-Fraga, A. R.; Vasconcelos-Pacheco, A.; Díaz-García, A.; Bustamante-Sánchez, M.; Estévez-Hernández, O., Evaluación de diferentes aroiltiureas como ionóforos en sensores de plomo (II). *Revista Cubana de Química* **2015**, *27* (3), 262-274.
55. Lima, J. L.; Machado, A. A., Procedure for the construction of all-solid-state PVC membrane electrodes. *Analyst* **1986**, *111* (7), 799-802.
56. Arada Pérez, M. d. I. A.; Yazdani-Pedram, M.; Pérez Saavedra, J. d. J., Sensores electroquímicos basados en sales cuaternarias de amonio. *Revista Cubana de Química* **2008**, *20* (1).
57. Le Goff, T.; Braven, J.; Ebdon, L.; Scholefield, D., High-Performance Nitrate-Selective Electrodes Containing Immobilized Amino Acid Betaines as Sensors. *Analytical Chemistry* **2002**, *74* (11), 2596-2602.
58. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., Fundamentals and applications. *Electrochemical Methods* **2001**, *2*, 482.
59. Hernández Malo, R. Solid contact potentiometric sensors based on carbon nanomaterials. Universitat Rovira i Virgili.
60. Xu, D.; Zhu, W.; Wang, C.; Tian, T.; Cui, J.; Li, J.; Wang, H.; Li, G., Molecularly Imprinted Photonic Polymers as Sensing Elements for the Creation of Cross-Reactive Sensor Arrays. *Chemistry—A European Journal* **2014**, *20* (50), 16620-16625.
61. Sardesai, N. P.; Kadimisetty, K.; Faria, R.; Rusling, J. F., A microfluidic electrochemiluminescent device for detecting cancer biomarker proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405* (11), 3831-3838.
62. Rebelo, T. S. C. R.; Santos, C.; Costa-Rodrigues, J.; Fernandes, M. H.; Noronha, J. P.; Sales, M. G. F., Novel Prostate Specific Antigen plastic antibody designed with charged binding sites for an improved protein binding and its application in a biosensor of potentiometric transduction. *Electrochimica Acta* **2014**, *132*, 142-150.
63. Rebelo, T. S.; Noronha, J. P.; Galésio, M.; Santos, H.; Diniz, M.; Sales, M. G. F.; Fernandes, M. H.; Costa-Rodrigues, J., Testing the variability of PSA expression by different human prostate cancer cell lines by means of a new potentiometric device employing molecularly antibody assembled on graphene surface. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *59*, 1069-1078.
64. Jensen, F., *Introduction to computational chemistry*. John Wiley & sons: 2017.
65. Cantudo Agudo, R., Introducción a las técnicas de simulación molecular y su potencial aplicación en el ámbito de la ingeniería química. **2018**.
66. Medvedev, M. G.; Bushmarinov, I. S.; Sun, J.; Perdew, J. P.; Lyssenko, K. A., Density functional theory is straying from the path toward the exact functional. *Science* **2017**, *355* (6320), 49-52.
67. Fedorov, D. G., The fragment molecular orbital method: theoretical development, implementation in GAMESS, and applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2017**, *7* (6), e1322.
68. Krylov, A. I.; Gill, P. M., Q-Chem: an engine for innovation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2013**, *3* (3), 317-326.

69. Pestana, L. R.; Mardirossian, N.; Head-Gordon, M.; Head-Gordon, T., Ab initio molecular dynamics simulations of liquid water using high quality meta-GGA functionals. *Chemical science* **2017**, *8* (5), 3554-3565.
70. Aquilante, F.; Autschbach, J.; Carlson, R. K.; Chibotaru, L. F.; Delcey, M. G.; De Vico, L.; Fdez. Galván, I.; Ferré, N.; Frutos, L. M.; Gagliardi, L., Molcas 8: New capabilities for multiconfigurational quantum chemical calculations across the periodic table. *Journal of computational chemistry* **2016**, *37* (5), 506-541.
71. Aquilante, F.; Pedersen, T. B.; Veryazov, V.; Lindh, R., MOLCAS—a software for multiconfigurational quantum chemistry calculations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2013**, *3* (2), 143-149.
72. Chen, X.; Chen, F.; Jónsson, E.; Forsyth, M., Molecular Dynamics Study of a Dual-Cation Ionomer Electrolyte. *ChemPhysChem* **2017**, *18* (2), 230-237.
73. Sun, Q.; Berkelbach, T. C.; Blunt, N. S.; Booth, G. H.; Guo, S.; Li, Z.; Liu, J.; McClain, J.; Sayfutyarova, E. R.; Sharma, S., The python-based simulations of chemistry framework (PySCF). *arXiv preprint arXiv:1701.08223* **2017**.
74. Alden, K.; Read, M.; Timmis, J.; Andrews, P. S.; Veiga-Fernandes, H.; Coles, M., Spartan: a comprehensive tool for understanding uncertainty in simulations of biological systems. *PLoS computational biology* **2013**, *9* (2), e1002916.
75. Kolb, B.; Marshall, P.; Zhao, B.; Jiang, B.; Guo, H., Representing global reactive potential energy surfaces using Gaussian processes. *The Journal of Physical Chemistry A* **2017**, *121* (13), 2552-2557.
76. Pardeshi, S.; Patrikar, R.; Dhodapkar, R.; Kumar, A., Validation of computational approach to study monomer selectivity toward the template Gallic acid for rational molecularly imprinted polymer design. *Journal of molecular modeling* **2012**, *18* (11), 4797-4810.
77. Qiu, C.; Yang, W.; Zhou, Z.; Yan, Y.; Xu, W., Rational design and preparation of dibenzothiophene-targeting molecularly imprinted polymers with molecular dynamics approaches and surface-initiated activators regenerated by electron-transfer atom-transfer radical polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (41).
78. Song, Y. P.; Li, N.; Zhang, H. C.; Wang, G. N.; Liu, J. X.; Liu, J.; Wang, J. P., Dummy template molecularly imprinted polymer for solid phase extraction of phenothiazines in meat based on computational simulation. *Food chemistry* **2017**, *233*, 422-428.
79. Young, D., *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems*. John Wiley & Sons: 2004.
80. Del Cacho, C. Polímeros de impresión molecular para la determinación de insecticidas. Tesis (Doctorado en ciencias). Madrid, España, Universidad Complutense de ..., 2009.
81. Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. á., Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensors and actuators B: Chemical* **1990**, *1* (1), 244-248.
82. Erickson, D., Towards numerical prototyping of labs-on-chip: modeling for integrated microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics* **2005**, *1* (4), 301-318.
83. Reyes, D. R.; Iossifidis, D.; Auroux, P.-A.; Manz, A., Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical chemistry* **2002**, *74* (12), 2623-2636.
84. Parra-Cabrera, C.; Samitier, J.; Homs-Corbera, A., Multiple biomarkers biosensor with just-in-time functionalization: Application to prostate cancer detection. *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, *77*, 1192-1200.
85. Orriach Fernández, F. J., Desarrollo de nuevos materiales para la determinación y/o eliminación de analitos con interés ambiental. **2016**.

86. Umezawa, Y.; Umezawa, K.; Bühlmann, P.; Hamada, N.; Aoki, H.; Nakanishi, J.; Sato, M.; Xiao, K. P.; Nishimura, Y., Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part II. Inorganic anions (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry* **2002**, *74* (6), 923-994.
87. Arcila, J. F. U., La bioquímica del antígeno específico de próstata (AEP) y sus fracciones. *Medicina & Laboratorio* **2008**, *14* (03-04), 153-166.
88. Shamsipur, M.; Naseri, M. T.; Babri, M., Quantification of candidate prostate cancer metabolite biomarkers in urine using dispersive derivatization liquid–liquid microextraction followed by gas and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, *81–82*, 65-75.
89. Lowell, S.; Shields, J. E.; Thomas, M. A.; Thommes, M., Gas adsorption. In *Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density*, Springer: 2004; pp 5-10.
90. Urraca, J. L.; Carbajo, M. C.; Torralvo, M. J.; González-Vázquez, J.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C., Effect of the template and functional monomer on the textural properties of molecularly imprinted polymers. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24* (1), 155-161.
91. Groen, J. C.; Peffer, L. A.; Pérez-Ramírez, J., Pore size determination in modified micro-and mesoporous materials. Pitfalls and limitations in gas adsorption data analysis. *Microporous and mesoporous materials* **2003**, *60* (1-3), 1-17.
92. Greeg, S.; Sing, K., Porosity. **1982**.
93. Sing, K., The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, *187*, 3-9.
94. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E., Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics. *Chemical Reviews* **1997**, *97* (8), 3083-3132.