



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Trabajo de Tesis Doctoral**

**“EMPLEO DE POLÍMEROS IMPRESOS NANOESTRUCTURADOS EN EL  
DESARROLLO DE OPTOSENSORES”**

**Lic. Roberta Grisel Machicote**

**Dirección: Dra. Liliana Bruzzone**

**Año 2013**



El presente trabajo se llevó a cabo en la Cátedra de Métodos Ópticos de la División Química Analítica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, bajo la dirección de la Doctora Liliana Bruzzone.

El mismo se presenta a consideración de las autoridades de dicha Facultad a fin de acceder al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.



## **AGRADECIMIENTOS**

*La defensa de esta tesis doctoral es consecuencia del aporte de varias personas a quienes les agradezco con estas letras su esfuerzo y dedicación.*

*En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mi directora, Lilibiana, por su total disposición y su buena voluntad para ayudarme en todo, tanto a nivel profesional como personal. Por darme el empujón necesario para terminar el trabajo de tesis. Por sus impagables enseñanzas, sus charlas y consejos que van a perdurar en mí para siempre.*

*A Marcela Castillo por ayudarme muchísimo en el desarrollo experimental y por transmitirme sus conocimientos sin reservas.*

*A Emilia Pacheco por su ayuda y compañerismo.*

*A todos los integrantes del LIDMA por su inestimable ayuda y por los buenos ratos compartidos. Especialmente a Emilia y Juan por las charlas y gestos de amistad.*

*A mi familia por su ayuda y acompañamiento.*

## OBJETIVOS

El plan de tesis propuesto tiene como objetivo general "evaluar la utilización de polímeros impresos nanoestructurados como fases sensoras en el desarrollo de sensores ópticos para la determinación selectiva de benzodiazepinas".

A continuación se mencionan los objetivos específicos que han dirigido el desarrollo de este trabajo de investigación:

- Estudiar las propiedades ópticas de las benzodiazepinas y las condiciones bajo las cuales se produce la hidrólisis de las mismas. La caracterización luminiscente incluye el registro de los espectros de absorción UV, excitación/emisión de fluorescencia y de fosforescencia a temperatura ambiente.
- Investigar la manera en que las benzodiazepinas interactúan con biopolímeros. Esto da una idea de los enlaces que hay que intentar reproducir a través de fases sensoras artificiales, que tienen la capacidad de sustituir la función que desempeñan las sustancias bioquímicas.
- Sintetizar polímeros impresos con benzodiazepinas utilizando diferentes tipos y concentraciones de precursores, optimizando las condiciones de síntesis para maximizar el proceso de impresión.
- Evaluar las propiedades de reconocimiento selectivo de los polímeros sintetizados para seleccionar aquel que presente las mejores características para ser utilizado como fase sensora.
- Explorar la utilización de las fases sensoras seleccionadas como medio de reconocimiento selectivo en la fabricación de sensores que permitan el análisis por inyección en flujo de benzodiazepinas. En esta etapa es necesario establecer un diseño del dispositivo de medida según las variables instrumentales y optimizar las condiciones de análisis.
- Evaluar el desempeño analítico de los ensayos fluorescentes para la cuantificación de benzodiazepinas, como así también la reactividad cruzada frente a analitos estructuralmente relacionados.

- Aplicar el método desarrollado al análisis de muestras reales y comparar los resultados con aquellos que se obtienen utilizando otros métodos.

# ÍNDICE GENERAL

## **I. INTRODUCCIÓN**

A. Las benzodiazepinas.....	1
A.1. Introducción histórica.....	1
A.2. Estructura química.....	2
A.3. Síntesis.....	2
A.4. Solubilidad.....	2
A.5. Metabolismo.....	2
A.6. Mecanismo de acción.....	4
A.7. Efectos secundarios.....	6
B. Polímeros de impresión molecular.....	8
B.1. Principios generales y perspectiva histórica.....	8
B.2. Síntesis.....	9
B.3. Aplicaciones de los MIPs.....	19
C. Sensores.....	23
C.1. Sensores ópticos.....	25

## **II. HERRAMIENTAS**

A. Reactivos y disoluciones.....	29
B. instrumentación analítica.....	30

## **III. EXPERIMENTAL-RESULTADOS**

<b>CAPÍTULO 1: “Estudio fluorescimétrico de la interacción entre benzodiazepinas y seroalbúmina bovina”</b>	33
A. Características espectroscópicas de las benzodiazepinas.....	37
A.1. Medidas de absorción UV-visible.....	37
A.2. Medidas de fluorescencia.....	40
B. Estudio del quenching de la fluorescencia de la SAB.....	45



B.1. Fundamentos.....	45
B.2. Medidas del quenching de BSA por benzodiazepinas.....	45
B.3. Determinación del mecanismo de quenching.....	47
C. Características del fenómeno de asociación.....	51
C.1. Cálculo de la constante de unión entre BDZs y SAB.....	51
C.2. Determinación de los modos de unión.....	54
C.3. Cálculo de la distancia de unión.....	56
D. Investigación conformacional.....	60
<b>CAPÍTULO 2: "Síntesis de polímeros impresos para su aplicación en la detección de oxazepam"</b>	64
A. Experiencias preliminares.....	66
A.1. Características espectroscópicas de oxazepam.....	66
A.2. Estudio de la hidrólisis de oxazepam.....	69
A.3. Características espectroscópicas de la 2-a,5-clbenzofenona.	79
B. Preparación del polímero impreso.....	81
B.1. Análisis espectroscópico de prepolimerización.....	81
B.2. Síntesis inicial del polímero impreso.....	83
B.3. Influencia de las condiciones de polimerización.....	84
B.4. preparación de los polímeros de trabajo.....	91
<b>CAPÍTULO 3: "Desarrollo de un optosensor utilizando MIPs como fase de reconocimiento selectivo"</b>	95
A. Sistema de análisis en flujo.....	97
A.1. Dispositivo de medida.....	97
A.2. Respuesta del optosensor.....	98
A.3. Optimización de las condiciones experimentales del sistema	103
A.4. Condiciones para el análisis por inyección en flujo.....	107
B. Características analíticas del ensayo.....	108
B.1. Curvas de calibración.....	108

B.2. Intervalo lineal.....	112
B.3. Límites de detección y cuantificación.....	112
B.4. Repetibilidad del método.....	113
B.5. Estabilidad de la fase sensora.....	114
C. Aplicación analítica.....	116
C.1. Determinación de oxazepam en compuestos farmacéuticos.	116
<b><u>III. CONCLUSIONES</u></b>	123
<b><u>IV. REFERENCIAS</u></b>	127

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de las 1,4-benzodiazepinas.....	2
<b>Figura 2.</b> Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA y de las benzodiazepinas en neuronas en el cerebro.....	5
<b>Figura 3.</b> Esquema de las etapas de síntesis de los MIPs.....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema de un biosensor.....	24
<b>Figura 5.</b> Estructura tridimensional de la seroalbúmina bovina.....	35
<b>Figura 6.</b> Espectros de absorción de lorazepam, oxazepam y bromazepam.....	39
<b>Figura 7.</b> Espectro de absorción de SAB.....	40
<b>Figura 8.</b> Diagrama de energía de un sistema fotoluminiscente.....	41
<b>Figura 9.</b> Espectros de emisión de fluorescencia de triptofano, tirosina y fenilalanina.....	43
<b>Figura 10.</b> Espectros de excitación de fluorescencia de triptofano, tirosina y fenilalanina.....	44
<b>Figura 11.</b> Espectro de emisión de fluorescencia de la SAB, con excitación a 295 nm.....	44
<b>Figura 12.</b> Quenching de la fluorescencia de la SAB por efecto de las BDZs.....	46
<b>Figura 13.</b> Gráficos de Stern-Volmer para el quenching de la SAB por benzodiazepinas.....	48
<b>Figura 14a.</b> Gráficos de Stern-Volmer para el quenching de la SAB por lorazepam a tres temperaturas.....	49
<b>Figura 14b.</b> Gráficos de Stern-Volmer para el quenching de la SAB por oxazepam a tres temperaturas.....	50
<b>Figura 14c.</b> Gráfico de Stern-Volmer para el quenching de la SAB por bromazepam a tres temperaturas.....	50
<b>Figura 15.</b> Gráficos doble logarítmicos del efecto que producen: lorazepam, oxazepam y bromazepam sobre la fluorescencia de SAB a 17°C, 24°C y 34°C.....	52
<b>Figura 16a.</b> Superposición del espectro de fluorescencia de SAB con el espectro de absorción lorazepam .....	56
<b>Figura 16b.</b> Superposición del espectro de fluorescencia de SAB con los espectros de absorción de loxazepam y bromazepam.....	57
<b>Figura 17a.</b> Espectros de fluorescencia sincrónica de la interacción	

entre SAB y benzodiazepinas.....	61
<b>Figura 17b.</b> Espectros de fluorescencia sincrónica de la interacción entre SAB y bromazepam.....	62
<b>Figura 18.</b> Espectros de absorción de OXA en: (a) cloroformo y (b) etanol.....	67
<b>Figura 19.</b> Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de OXA.....	68
<b>Figura 20.</b> Espectro de fluorescencia de OXA en 3D.....	68
<b>Figura 21.</b> Reacción de hidrólisis del oxazepam.....	69
<b>Figura 22.</b> Superposición de los espectros de (a) emisión de fluorescencia y (b) absorción, de oxazepam y 2-amino-5-clorobenzofenona.....	70
<b>Figura 23.</b> Primeras derivadas de los espectros de absorción de OXA y BZF.....	71
<b>Figuras 24a, 24b y 24c.</b> Gráficos correspondientes a la calibración para OXA.....	72
<b>Figuras 25a, 25b y 25c.</b> Gráficos correspondientes a la calibración para BZF.....	73
<b>Figura 26.</b> Espectros de absorción de una disolución de oxazepam antes y después de ser sometida a ebullición.....	74
<b>Figura 27a.</b> Espectros de absorción de soluciones de OXA sometidas a hidrólisis en presencia de distintos ácidos en concentraciones 0,1M...	75
<b>Figura 27b.</b> Derivadas primeras de los espectros de absorción de OXA.....	76
<b>Figura 28a.</b> Espectros de absorción de soluciones de OXA sometidas a hidrólisis en presencia de distintas concentraciones de ácido clorhídrico.....	77
<b>Figura 28b.</b> Espectros de absorción de soluciones de OXA sometidas a hidrólisis en presencia de distintas concentraciones de ácido clorhídrico.....	78
<b>Figura 29.</b> Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de una solución acuosa de BZF.....	79
<b>Figura 30.</b> Espectros de excitación y emisión de fosforescencia de BZF.....	80
<b>Figura 31.</b> Cambios en el espectro de absorción de BZF por efecto de la adición de MAA.....	82

<b>Figura 32.</b> Cromatograma de BZF.....	86
<b>Figura 33.</b> Curva de calibración para BZF.....	86
<b>Figura 34.</b> Áreas de pico correspondientes a BZF remanente en solución transcurrido el período de incubación con cada MIP / NIP.....	89
<b>Figura 35.</b> Áreas de pico correspondientes a BZF remanente en solución transcurrido el período de incubación con cada MIP.....	90
<b>Figura 36.</b> Esquema de síntesis de los MIPs.....	93
<b>Figura 37.</b> Esquema del dispositivo de medida en flujo.....	97
<b>Figura 38.</b> Esquema de la celda de flujo utilizada.....	98
<b>Figura 39.</b> Selección de las condiciones instrumentales para la primera evaluación en flujo.....	99
<b>Figura 40.</b> Retención / elución de BZF en el interior del polímero impreso.....	100
<b>Figura 41.</b> Elución de BZF por el interior del polímero no impreso.....	101
<b>Figura 42a.</b> Espectro de emisión del polímero seco; con excitación a 220 nm.....	101
<b>Figura 42b.</b> Espectro de emisión del polímero humedecido con metanol; con excitación a 220 nm.....	102
<b>Figura 42c.</b> Espectro de emisión del polímero en contacto con solución de BZF; excitando a 220 nm.....	102
<b>Figura 43.</b> Diagrama para BZF.....	103
<b>Figura 44.</b> Perfil de respuesta obtenido.....	104
<b>Figura 45.</b> Inyecciones de BZF utilizando como solución portadora isopropanol/hexano (v:v): (a) 10:90 y (b) 20:80 .....	105
<b>Figura 46.</b> Inyecciones de BZF utilizando como solución portadora isopropanol/hexano (v:v): (c) 30:70, (d) 50:50 y (e) 70:30.....	106
<b>Figura 47.</b> Curva de calibración 1.....	109
<b>Figura 48.</b> Curva de calibración 2.....	109
<b>Figura 49.</b> Curva de calibración por adiciones estándar.....	120
<b>Figura 50.</b> Curva de calibración de Youden.....	120

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Nombres de las 1,4-benzodiazepinas de acuerdo a sus sustituyentes.....	2
<b>Tabla 2.</b> Monómeros funcionales comúnmente utilizados para la síntesis de MIPS.....	14
<b>Tabla 2 (cont.).</b> Monómeros funcionales comúnmente utilizados para la síntesis de MIPS.....	15
<b>Tabla 3.</b> Transiciones electrónicas que involucran orbitales moleculares $\sigma$ , $n$ y $\pi$ .....	38
<b>Tabla 4.</b> Constantes de quenching para la interacción de benzodiazepinas con SAB.....	48
<b>Tabla 5.</b> Constantes y sitios de unión a tres temperaturas para los sistemas benzodiazepinas-SAB.....	54
<b>Tabla 6.</b> Parámetros termodinámicos correspondientes a los sistemas benzodiazepina-SAB.....	55
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de transferencia de energía para los sistemas benzodiazepina-SAB.....	59
<b>Tabla 8.</b> Resultados del análisis de regresión para las calibraciones de OXA y BZF.....	74
<b>Tabla 9.</b> Condiciones óptimas de hidrólisis para OXA.....	78
<b>Tabla 10.</b> Composición de los polímeros ensayados para seleccionar la relación [monómero] / [molde].....	87
<b>Tabla 11.</b> Composición de los polímeros ensayados para seleccionar la relación [entrecruzante] / [monómero].....	90
<b>Tabla 12.</b> Condiciones óptimas para la síntesis de polímeros impresos con BZF.....	91
<b>Tabla 13.</b> Condiciones experimentales seleccionadas para el análisis en flujo.....	107
<b>Tabla 14.</b> Resultados del análisis de regresión para las curvas 1 y 2...	110
<b>Tabla 15.</b> Resultados del análisis de regresión para las calibraciones con soluciones patrones y por adiciones estándar.....	117

**I**

---

**INTRODUCCIÓN**





## **A. LAS BENZODIAZEPINAS**

### **A.1. Introducción histórica**

Hasta finales de los años 60, los síntomas de la ansiedad y el insomnio eran tratados principalmente con barbitúricos. Estos fármacos, además de tener una eficacia limitada en la ansiedad, causaban dependencia y severos síndromes de retirada tras una supresión brusca del tratamiento.

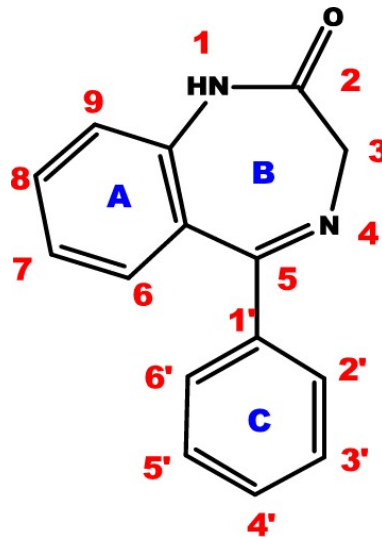
En 1955, los laboratorio Roche en Nutley, New Jersey, sintetizaron la primera benzodiazepina en ser comercializada. El descubrimiento del clordiazepóxido, y el desarrollo de numerosos análogos, condujeron rápidamente al reemplazo de los barbitúricos por uno de los grupos farmacológicos más ampliamente prescritos a nivel mundial.

Las benzodiazepinas (BZDs) son medicamentos psicotrópicos que actúan sobre el sistema nervioso central, con efectos sedantes e hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos, amnésicos y miorreajantes. Son usadas en medicina para la terapia de la ansiedad, insomnio y otros estados anímicos, así como las epilepsias, abstinencia alcohólica y espasmos musculares. Son también usadas en ciertos procedimientos invasivos como la endoscopia o para inducir sedación y anestesia [1]. Los individuos que abusan de drogas estimulantes con frecuencia se administran benzodiazepinas para calmar su estado anímico. A menudo se usan benzodiazepinas para tratar los estados de pánico causados en las intoxicaciones por alucinógenos.

Las benzodiazepinas han mostrado tener menos efectos secundarios que los barbitúricos, ser relativamente seguras en sobredosis y tener menos riesgo de dependencia. Así, estos fármacos se convirtieron en los psicotrópicos más ampliamente usados en todo el mundo. Sin embargo, en los últimos años las asociaciones públicas han expresado su preocupación sobre la posible prescripción excesiva de estos fármacos advirtiendo sobre la capacidad de los mismos para producir efectos secundarios graves y dependencia farmacológica [2].

## A.2. Estructura química

El término benzodiazepina se refiere a la porción en la estructura química de estos medicamentos compuesta por un anillo de benceno unido a otro anillo de siete miembros heterocíclico llamado diazepina. Cada BZD específica surge por sustitución de radicales en diferentes posiciones (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura química de las 1,4-benzodiazepinas.

Benzodiazepina comercial	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> '	R <sub>7</sub>	Nombre
Clorazepato	H	COOH	H	Cl	Tranxilium
Diazepam	CH <sub>3</sub>	H	H	Cl	Valium
Flunitrazepam	CH <sub>3</sub>	H	F	NO <sub>2</sub>	Rohypnol
Lorazepam	H	OH	Cl	Cl	Orfidal
Lormetazepam	CH <sub>3</sub>	OH	Cl	Cl	Noctamid
Nitrazepam	H	H	H	NO <sub>2</sub>	Mogadon
Oxazepam	H	OH	H	Cl	Serax
Bromazepam	H	OH	H	H	Lexotanil

**Tabla 1.** Nombres de las 1,4-benzodiazepinas de acuerdo a sus sustituyentes.

Las BZDs más utilizadas se pueden dividir en tres subgrupos [3]:

- 1,4-Benzodiazepinas: contienen átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 4 del anillo diazepínico. A este grupo pertenecen las BZDs más

importantes desde el punto de vista terapéutico, e incluyen a diazepam, clordiazepóxido y lorazepam.

- 1,5-Benzodiazepinas: contienen átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 5 de anillo diazepínico. Ej. Clobazam.
- BZDs tricíclicas: se componen a menudo del núcleo 1,4 benzodiazepina con un anillo adicional acoplado en las posiciones 1 y 2. Algunos miembros de este grupo son el alprazolam, el triazolam y el midazolam.

### **A.3. Síntesis**

En la literatura se encuentran diversos procedimientos de síntesis de BDZs y sus derivados entre los cuales pueden mencionarse: síntesis por la reacción entre o-fenilendiamina con diferentes tipos de metilcetonas en presencia de  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  como catalizador a temperatura ambiente [4]; síntesis de 3-hidroxi-1,4-benzodiazepinas (oxazepam y lorazepam) basada en la reacción de acetoxilación de la posición 3 del anillo diazepínico [5]; síntesis de derivados de 1,5-benzodiazepines en condiciones de ausencia de solvente partiendo de o-fenilendiaminas y cetonas en presencia de ácido acético por irradiación con microondas [6] o utilizando cloruro de zinc como catalizador a 80-85 °C [7].

### **A.4. Solubilidad**

Las BDZs son solubles en solventes orgánicos tales como metanol, etanol, dimetilformamida y cloroformo, ligeramente solubles en hexano o heptano y prácticamente insolubles en agua.

### **A.5. Metabolismo**

Las BZD ejercen su acción mediante la interacción con receptores situados en el sistema nervioso central (SNC), el determinante principal de la ocupación de esos receptores es la concentración absoluta de fármaco en el plasma sistémico. Los cambios cronológicos de la ocupación de los receptores dependerán de las variaciones en las concentraciones cerebrales totales, las cuales dependen del patrón farmacocinético de distribución, eliminación y aclaramiento sistémicos.

Las BZD pueden dividirse en tres grupos en base a su perfil metabólico [8]:

**Grupo I:** aquellas que son biotransformadas en el hígado por reacciones oxidativas (N-desmetilación, hidroxilación), generando frecuentemente metabolitos activos que antes de su excreción también son metabolizados. Un ejemplo es el clordiazepóxido, que origina varios metabolitos activos importantes desde el punto de vista clínico.

**Grupo II:** benzodiazepinas conjugadas; no tienen metabolitos activos por lo que la actividad reside en el compuesto original [9].

**Grupo III:** aquellas que experimentan un fuerte efecto de un primer paso metabólico antes de acceder a la circulación sistémica y su velocidad metabólica está muy unida al flujo sanguíneo hepático. Pueden tener metabolitos de corta vida media pero activos, por ejemplo triazolam y midazolam.

Las BZD que experimentan múltiples pasos metabólicos se acumulan de forma gradual y son eliminadas con más lentitud del organismo. Los metabolitos tienen su propia vida media de eliminación, usualmente 30-50% más larga que el compuesto parental. En ancianos la vida media de eliminación se duplica o se triplica con frecuencia debido a la menor eficacia de la biotransformación hepática. En conjunto, las BZDs que se eliminan con más rapidez del organismo se conocen como benzodiazepinas de vida media corta y se acumulan en la sangre en menor medida, pero con más rapidez que las de vida media larga, eliminándose también más rápidamente [10].

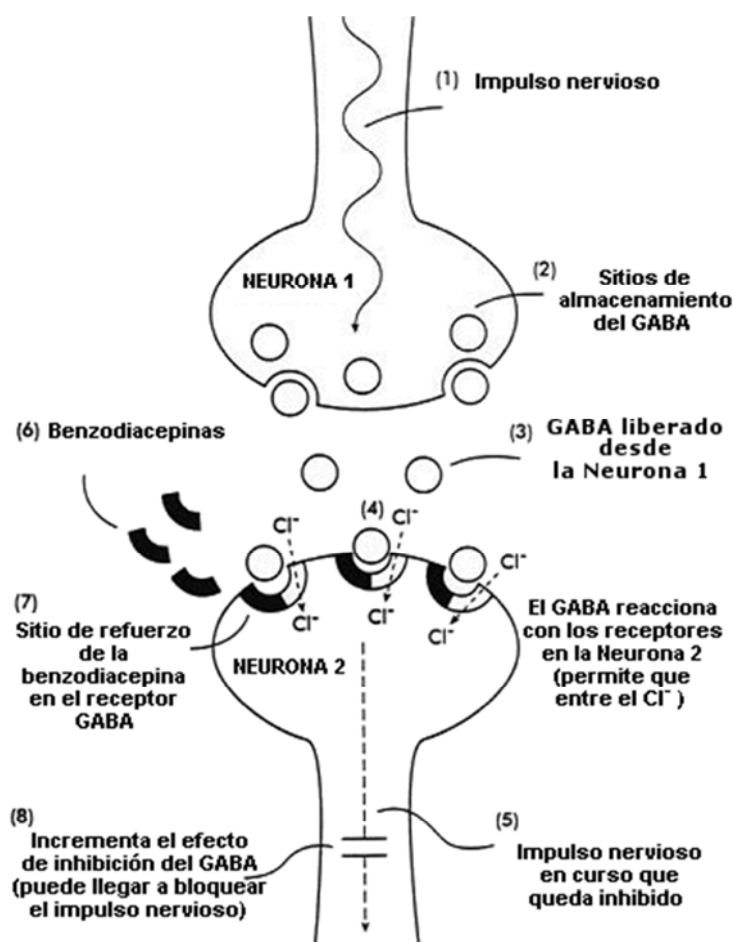
## **A.6. Mecanismo de acción**

Las BZD son agentes depresores del sistema nervioso actuando, en particular, sobre el sistema límbico. Las BZD comparten estructura química similar y tienen gran afinidad con el complejo de receptores benzodiazepínicos en el sistema nervioso central.

Cualquier persona que luche por suspender la toma de benzodiazepinas se dará cuenta de que, además de los efectos terapéuticos, estas drogas ejercen otros efectos profundos en la mente y en el organismo. Las

benzodiazepinas, en efecto, influyen directa o indirectamente en casi todos los aspectos de las funciones cerebrales.

Todas las benzodiazepinas actúan aumentando la acción de una sustancia química natural del cerebro, el GABA (ácido gamma-aminobutírico). El GABA es un neurotransmisor, es decir, un agente que transmite mensajes desde una célula cerebral (neurona) hacia otra. El mensaje que el GABA transmite es un mensaje de inhibición: le comunica a las neuronas con las que se pone en contacto que disminuyan la velocidad o que dejen de transmitir. Como más o menos el 40% de los millones de neuronas del cerebro responden al GABA, esto significa que el GABA tiene un efecto general tranquilizante en el cerebro: de cierta forma, es el hipnótico y tranquilizante natural con que cuenta el organismo. Las benzodiazepinas aumentan esta acción natural del GABA, ejerciendo de esta forma una acción adicional (frecuentemente excesiva) de inhibición en las neuronas (figura 2).



**Figura 2.** Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA y de las benzodiazepinas en neuronas en el cerebro  
(<http://benzo.org.uk/manual/bzcha01.htm>, 3.3.2008).

En la figura 2 puede observarse la siguiente secuencia de procesos:

**(1,2)** Impulso nervioso que hace que el GABA sea liberado de los sitios en que está almacenado en la neurona 1; **(3)** el GABA es liberado en el espacio interneuronal.

**(4)** El GABA reacciona con los receptores de la neurona 2; la reacción permite la entrada de los iones cloruro (Cl<sup>-</sup>) en la neurona; **(5)** este efecto inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso, **(6,7)** las benzodiazepinas reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA y **(8)** esta acción aumenta los efectos inhibidores del GABA, por lo que el impulso nervioso en curso puede quedar bloqueado completamente.

La forma en que el GABA transmite su mensaje inhibitor es a través de lo que podríamos llamar un dispositivo electrónico inteligente. Su reacción con los sitios especiales (receptores GABA) ubicados en la parte exterior de la neurona que lo recibe abre un canal, permitiendo así que las partículas con carga negativa (iones cloruro) entren en la neurona. Estos iones negativos "sobrecargan" la neurona, debilitando la respuesta de la misma a otros neurotransmisores que, en condiciones normales, la excitarían. Las benzodiazepinas también reaccionan en sus propios sitios especiales (receptores benzodiazepínicos) que precisamente están ubicados en los receptores GABA. La combinación de una benzodiazepina con su receptor potencia la acción del GABA, lo cual permite que entre en las neuronas una mayor cantidad de iones de cloruro, aumentando así la resistencia de la neurona a la excitación. Los distintos subtipos de receptores benzodiazepínicos tienen acciones levemente distintas. Uno de estos subtipos, (el alfa 1) es el responsable de los efectos sedativos, otro (el alfa 2) es el que ejerce efectos ansiolíticos, mientras que ambos, el alfa 1 y el alfa 2, como también el alfa 5, son los responsables de los efectos anticonvulsivos. Todas las benzodiazepinas se combinan, en mayor o menor grado, con todos estos subtipos y todas aumentan la actividad del GABA en el cerebro.

### **A.7. Efectos secundarios**

Como resultado del incremento de la actividad inhibitora del GABA causada por las benzodiazepinas, disminuye la producción cerebral de

neurotransmisores excitativos, incluso se reduce la producción de norepinefrina (noradrenalina), serotonina, acetil-colina y dopamina. Estos neurotransmisores excitativos son necesarios para las funciones involucradas en el estado normal de vigilia y alerta, memoria, tono muscular y coordinación, respuestas emocionales, secreciones de las glándulas endocrinas, control del ritmo cardíaco y de la tensión sanguínea y para muchas otras funciones, todas las cuales pueden ser perjudicadas por las benzodiazepinas. Hay otros receptores benzodiazepínicos, no relacionados con el GABA, que se encuentran en el riñón, colon, células sanguíneas y corteza suprarrenal, y que pueden ser afectados por algunas benzodiazepinas. Estos efectos directos e indirectos son responsables de los bien conocidos efectos adversos causados por el uso de las benzodiazepinas.

Los efectos secundarios más destacados y característicos son la sedación y la somnolencia. También producen con frecuencia ataxia, disartria, incoordinación, diplopía y vértigo. En general, los efectos secundarios están en relación con la dosis y la susceptibilidad individual, siendo los pacientes ancianos los más susceptibles.

Las BZD interaccionan con fármacos hipnóticos y con el alcohol, que potencian la sedación sobre el SNC, y aumentan también el efecto euforizante de los opiáceos. Otros de los efectos característicos de las BZD son la alteración de la memoria y el rendimiento psicomotor [11].

## **B. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR**

### **B.1. Principios generales y perspectiva histórica**

Los polímeros de impresión molecular (MIPs) traducido del término inglés "molecular imprinted polymers" son matrices sintéticas que se comportan como receptores biomiméticos artificiales, capaces de reconocer e interactuar de forma específica con el analito para el cual han sido sintetizados. Dicho reconocimiento se basa en la creación, durante el proceso de polimerización, de cavidades que son complementarias, en tamaño, forma y funcionalidad química al analito que fue empleado como molde en la síntesis de los polímeros [12].

La historia de la tecnología de impresión molecular se remonta a 1931 [13], año en el que Polyakov descubrió que el gel de sílice era capaz de reconocer a determinados aditivos. Polyakov obtenía el gel mediante acidificación de soluciones de silicato de sodio y al secarlo se generaba una matriz rígida. En un trabajo [14] publicado en ese mismo año, reportó los efectos sobre la estructura de los poros de la sílice cuando se la secaba en presencia de benceno, tolueno y xileno. Otros de sus trabajos, publicados en 1933 [15] y 1937 [16] contienen investigaciones más detalladas acerca del fenómeno de reconocimiento molecular.

Basándose en la teoría de la formación de los anticuerpos postulada por Linus Pauling, Dickey fue capaz de explicar los hallazgos de Polyakov, al demostrar el reconocimiento por parte de la sílice de diferentes indicadores derivados del naranja de metilo que se encontraban presentes durante la obtención del gel de sílice [17]. La diferencia más importante entre los métodos de Polyakov y de Dickey reside en que el último introduce la molécula "molde" en la mezcla de prepolimerización de silicato de sodio mientras que Polyakov adiciona la molécula molde una vez que la estructura está formada. Las condiciones bajo las cuales la molécula molde se introduce al sistema de polimerización tienen un rol importante en la generación de los sitios de reconocimiento selectivo. En ese aspecto, el método de Dickey fue más utilizado en estudios posteriores y tiene mayor similitud con la metodología actual.



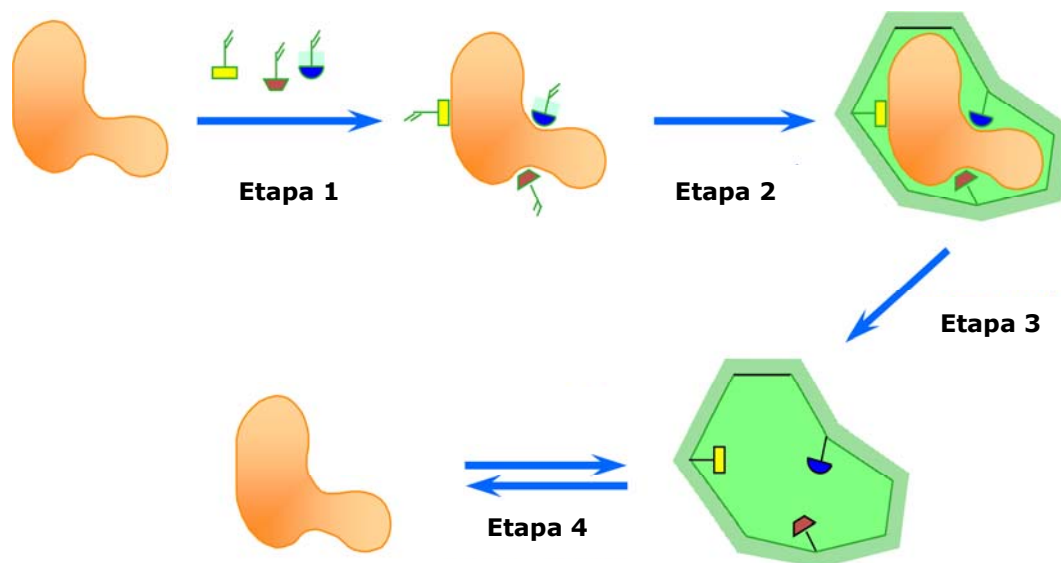
Luego de un período de 15 años de publicaciones en este tema, comenzó a decaer el interés en las experiencias de impresión sobre sílice; esto se debió, principalmente, a las limitaciones en la estabilidad y reproducibilidad en los materiales de sílice impresos. En el año 1972, los grupos de Klotz [18] y Wulff [19] presentaron, de manera independiente, los primeros ejemplos de impresión molecular en polímeros orgánicos sintéticos. A principios de los años 80 El grupo de Mosbach [20] introdujo un avance importante desarrollando un modelo no-covalente que amplió el campo de la impresión molecular. A partir de entonces el desarrollo de la tecnología de impresión molecular ha tenido un crecimiento progresivo; actualmente se publican numerosos trabajos que hacen uso de dicha tecnología [21-26].

Los MIPs, como elementos de reconocimiento, presentan una serie de ventajas entre las cuales pueden mencionarse:

- *Sensibilidad y selectividad.*
- *Posibilidad de desarrollo frente a diversos analitos.*
- *Estabilidad física: resistencia mecánica, a altas presiones y temperaturas.*
- *Estabilidad química: resistencia a diferentes condiciones de pH y solventes orgánicos.*
- *Especificidad teóricamente predecible.*
- *Bajo costo: uso repetido sin reducción en la capacidad de reconocimiento.*

## **B.2. Síntesis**

En términos generales, la técnica de impresión molecular se basa en la preparación de un polímero altamente entrecruzado en presencia del analito (molde) para el cual se desea el reconocimiento selectivo. La síntesis de los mismos consta de varias etapas las cuales se esquematizan en la figura 3.



**Figura 3.** Esquema de las etapas de síntesis de los MIPs.

En la **etapa 1** la molécula seleccionada como analito se pone en contacto con los monómeros funcionales disueltos en un solvente adecuado dando lugar a la formación de un complejo de prepolimerización.

En la **etapa 2** se lleva a cabo la polimerización en presencia de un exceso de agente entrecruzante. La polimerización por lo general sigue un mecanismo de propagación radicalario que puede ser inducido térmica o fotoquímicamente. En la **etapa 3** se extrae la molécula molde de la matriz polimérica, generando de esta manera las cavidades de reconocimiento que son complementarias en forma, tamaño y funcionalidad química al analito.

Por último, en la **etapa 4**, se provoca la unión de la molécula molde a las cavidades formadas. La presencia de estas cavidades hace que el polímero impreso sea capaz de reconocer de forma selectiva al analito o a otros compuestos análogos estructuralmente [27].

### **B.2.a. Modelos empleados en la síntesis de MIPs**

El proceso de impresión molecular comienza con la selección del modelo apropiado; puede darse un reconocimiento mediante fuerzas débiles (modelo no covalente) o bien un reconocimiento por fuerzas intensas (modelo covalente). Muchos factores influyen en la elección, el más importante es la molécula molde; el tipo y disponibilidad de grupos funcionales del analito juega un rol importante.

En el modelo de *impresión covalente* el mecanismo de formación del polímero implica la unión del analito al monómero funcional a través de un enlace covalente “reversible”.

La síntesis de estos polímeros es compleja ya que se requiere de la síntesis del compuesto analito-monómero como paso previo a la formación del polímero. La extracción de la molécula molde, en este caso, requerirá de medios químicos (hidrólisis ácida/básica). El reconocimiento del analito será obtenido por el restablecimiento de los enlaces covalentes. Ejemplos: éster borónico utilizado como monómero para la impresión de galactosa y fructosa [28], la utilización de enlaces acetal para la impresión de moléculas basadas en mono, diacetonas [29] y monoalcoholes o bases de Schiff para sintetizar polímeros selectivos para aminoácidos [30].

La ventaja fundamental de este tipo de polimerización reside en su elevada selectividad, ya que al realizarse la síntesis en condiciones estequiométricas, no hay monómeros fuera de las cavidades, lo que minimiza considerablemente la presencia de interacciones inespecíficas. Otra ventaja importante de estos polímeros es su elevada homogeneidad, lo que en principio es de gran interés para determinadas aplicaciones, como son su empleo como fases estacionarias en HPLC. Las limitaciones de este método de síntesis vienen dadas por el limitado número de monómeros capaces de formar enlaces covalentes reversibles con los analitos, la ruptura química de la plantilla del polímero y la lenta cinética de unión. Debido a estas limitaciones, y a pesar de haber sido los primeros polímeros en desarrollarse, su aplicación analítica ha sido considerablemente escasa.

En la *impresión no covalente*, el complejo de pre-polimerización formado entre el analito y el monómero funcional se forma mediante interacciones moleculares de carácter débil. Estas interacciones pueden darse en uno o más puntos de las moléculas e involucrar enlaces de hidrógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , dipolo-dipolo, electroestáticas y/o hidrofóbicas; las mismas ocurren durante el reconocimiento posterior de los analitos.

Una vez generada la matriz polimérica, la extracción de la molécula impresora no presenta grandes dificultades ya que un simple lavado del

polímero con el solvente apropiado permite el desplazamiento del analito de la matriz.

Debido a la amplia disponibilidad comercial de monómeros y analitos capaces de dar lugar a una interacción de este tipo, junto a la facilidad de la síntesis de estos materiales, los polímeros no covalentes son los más empleados en la actualidad [31, 32].

### **B.2.b. Factores que influyen en las propiedades de reconocimiento de los MIPs**

La selectividad y la capacidad de un polímero impreso se ven afectadas por las variables del proceso de impresión. Los parámetros de impresión deben seleccionarse de manera de generar un desplazamiento del equilibrio de pre-polimerización hacia la formación del complejo; esto ha motivado la publicación de numerosos trabajos [33-35] que evalúan la utilización de diferentes monómeros funcionales, agentes de entrecruzamiento, solventes, iniciadores y temperaturas de polimerización, etc., con la finalidad de obtener materiales de reconocimiento altamente específicos.

Debido al elevado número de variables que pueden llegar a influir en las características del polímero impreso, la optimización de las condiciones de síntesis resulta bastante complejo. Se han desarrollado varios métodos aproximados para facilitar dicha tarea entre los cuales pueden mencionarse el empleo de mini-MIPs, el diseño de experimentos y la modelización molecular. La técnica de mini-MIPs, que es la utilizada en la presente investigación, se basa en la utilización de pequeños volúmenes de cada uno de los reactivos que intervienen en la polimerización en diferentes viales, con una variación sistemática de las mezclas empleadas en la síntesis de los polímeros. Después de la extracción de la molécula molde, se lleva a cabo algún método de unión para evaluar el funcionamiento de los polímeros obtenidos. Aquellos polímeros con los cuales se obtiene un mayor grado de reconocimiento hacia el analito se sintetizan en mayores cantidades para una evaluación más detallada.

A continuación se detallan los distintos factores que pueden influir en las propiedades de reconocimiento de los MIPs.

### ***Monómero funcional***

Resulta obviamente importante que los monómeros funcionales interactúen fuertemente con la molécula molde y que formen con la misma complejos estables en un paso previo a la polimerización, ya que se supone que la fuerza y estructura de las uniones en solución definen la posterior afinidad y selectividad del polímero impreso [13].

Es crucial encontrar un monómero funcional adecuado, que complemente a la molécula molde y que maximice y estabilice la formación del complejo. En general, la selección del monómero se realiza en función de los grupos funcionales del analito; en algunos casos pueden combinarse distintos monómeros para incrementar las interacciones y mejorar la complementariedad de la molécula molde proporcionando una mejor selectividad.

La polimerización no covalente se puede llevar a cabo con un elevado número de monómeros, éstos pueden ser de naturaleza ácida, básica o neutra. Los monómeros derivados de los ácidos carboxílicos son los monómeros más utilizados en la preparación de MIPs no covalentes, debido a que son capaces de interactuar de múltiples maneras con una gran cantidad de analitos. Entre los posibles mecanismos de interacción de estos ácidos destacan su carácter tanto aceptor como dador de protones en la formación de enlaces por puente de hidrógeno, la formación de pares iónicos o la interacción a través de la formación de enlaces dipolo-dipolo [36]. El más utilizado es el ácido metacrílico (MAA), éste actúa mediante interacciones iónicas con las aminas y vía enlaces de hidrógeno con las amidas, carbamatos y grupos hidroxilo.

Cuando el analito es de naturaleza ácida, se puede recurrir al empleo de un monómero básico. Un ejemplo de éstos es la vinilpiridina, la cual en su forma básica presenta un anillo aromático pobre en electrones  $\pi$  que la hace capaz de interactuar de manera eficiente con analitos aromáticos ricos en electrones dando lugar a la formación de enlaces de tipo  $\pi$ - $\pi^*$ .

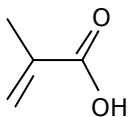
Por último, el monómero neutro más empleado es la acrilamida, que da lugar a la formación de puentes de hidrógeno más estables que el ácido metacrílico en medios apolares, siendo una buena alternativa el empleo de éste último en la preparación de fases estacionarias para HPLC.

Las estructuras de estos y otros monómeros funcionales comúnmente utilizados se presentan en la tabla 2 [13, 36].

---

### MONÓMEROS FUNCIONALES ÁCIDOS

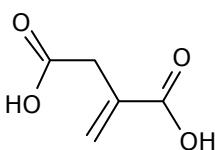
---



Ácido metacrílico (MAA)

**Aplicaciones:**

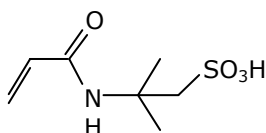
Impresión de derivados de aminoácidos [37], péptidos [38-40], morfina [41], derivados de monosacáridos [42], atenolol [43], tocoferoles [44] y demás moléculas [45-47].



Ácido p-vinilbenzoico (PVB)

**Aplicaciones:**

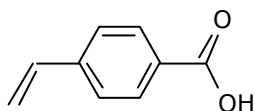
Impresión de derivados de aminoácidos [48].



Ácido acrilamidometilpropano sulfónico (AMPSA)

**Aplicaciones:**

Impresión de diaminoantraquinona [49], desmetrin (herbicida) [50], etc.



Ácido itacónico (ITA)

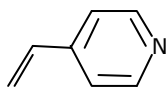
**Aplicaciones:**

Impresión de  $\beta$ -bloqueantes como (S-(-)-timolol) [51], (-) norefedrina [52], etc.

---

### MONÓMEROS FUNCIONALES BÁSICOS

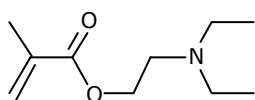
---



4-vinilpiridina (4VPY)

**Aplicaciones:**

Impresión de S-naproxen [53], derivados de aminoácidos [54,55], etc.



N,N-dietyl-2-aminoetilmetacrilato (DAEMA)

**Aplicaciones:**

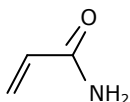
Impresión de atrazina [56].

**Tabla 2.** Monómeros funcionales comúnmente utilizados para la síntesis de MIPs.

---

**MONÓMEROS FUNCIONALES NEUTROS**

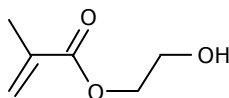
---

**Aplicaciones:**

Impresión de derivados de aminoácidos [57].

**Acrilamida (AAM)**

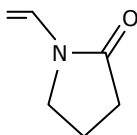
---

**Aplicaciones:**

Impresión de efedrina [58], colesterol [59], ácido salicílico [60].

**2-hidroxietilmetacrilato (HEMA)**

---

**Aplicaciones:**

Impresión de creatinina [61].

**N-vinilpirrolidona**

---

**Tabla 2 (cont.).** Monómeros funcionales comúnmente utilizados para la síntesis de MIPs.**Agente entrecruzante**

El entrecruzante debe ser capaz de interactuar con el complejo de prepolimerización y preservarlo durante la síntesis del polímero. Sus funciones más representativas se pueden resumir en [62]:

- Es el principal responsable de la morfología de la matriz polimérica;
- Estabiliza los sitios de unión selectivos formados;
- Confiere estabilidad mecánica al material sintetizado, y;
- Proporciona la porosidad adecuada para garantizar la accesibilidad del analito [63].

El etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) es el agente de entrecruzamiento más ampliamente utilizado en la síntesis de MIPs no covalentes. No obstante se encuentra en bibliografía la utilización de numerosos entrecruzadores, tales como divinilbenceno (DVB) [64], triacrilato de

pentaeritritol (PETRA) [65], trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM) [66], 1,4-butanodioldimetacrilato, bisfenol A-dimetacrilato [67], Metilen-bis-acrilamida [68], Etilen-bis-acrilamida [69], 1,4-diacriloilpiperazina, N,N'-bis-(acriloil)cistamina [70], etc.

En general, se utiliza gran cantidad de estos reactivos para asegurar las características anteriormente citadas, que requieren un grado de entrecruzamiento mayor del 80%.

### ***Disolvente o porógeno***

La elección del solvente con el que será llevada a cabo la síntesis es muy importante; esto se debe a que su naturaleza gobierna la fuerza de las interacciones e influye en la morfología final del material (tamaño y distribución de poros, área superficial), particularmente cuando la síntesis se lleva a cabo mediante el modelo de síntesis no covalente. Debido a la importante participación en la morfología se suele referir al disolvente como "porógeno". En general los solventes de polaridad moderada (por ejemplo acetonitrilo y cloroformo) o con baja constante dieléctrica (por ejemplo tolueno y diclorometano) son los más utilizados ya que favorecen la interacción analito- monómero funcional. Si el disolvente es polar, compite con los monómeros funcionales por los puntos de interacción con la molécula molde [71].

### ***Iniciador radicalario***

La elección del iniciador radicalario se lleva a cabo en función de la estabilidad del resto de los reactivos empleados. La polimerización puede comenzar por empleo de radiación UV o por inducción térmica, dependiendo de la estructura del iniciador. El más utilizado es el 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN), como iniciador fotoquímico a baja temperatura o como iniciador térmico a más de 60°C de temperatura. Cuando la molécula molde es térmicamente inestable es posible generar radicales libres a baja temperatura (< 4°C), mediante radiación UV empleando, por ejemplo, la dimetoxifenil acetofenona.



Otros de los iniciadores utilizados en impresión molecular son el 1,1'-azobis (ciclohexanocarbonitrilo), 2,2'-azobis [(2,4-dimetilvaleronitrilo)] y el 4,4'-azobis [(4-(ácido cianoaléxico))] y el peróxido de benzoílo.

### **Metodología de polimerización**

El método de polimerización empleado influye sobre la morfología del polímero obtenido, pudiéndose obtener partículas esféricas mono- o polidispersas, partículas de tamaño de poro controlado, bloques, etc. El método de polimerización también puede afectar al reconocimiento de los analitos por parte del polímero; asimismo, el método de polimerización elegido variará en función de la aplicación a la que esté destinada, así, por ejemplo, se han desarrollado métodos específicos de polimerización cuando el polímero se va a utilizar como fase estacionaria en cromatografía o electrocromatografía capilar [72].

A continuación se describen los métodos de polimerización más utilizados en la preparación de polímeros de impresión molecular en el campo de la química analítica.

**Polimerización en bloque.** Fue el primer método empleado en la preparación de los MIPs; consiste en la polimerización radicalaria de una solución concentrada de monómeros [33]. La mezcla que contiene al analito, monómero, entrecruzante, iniciador y solvente se somete al proceso de polimerización, que puede estar iniciada tanto fotoquímica como térmicamente. Una vez concluida, se obtiene un monolito de polímero que se tritura y se tamiza hasta obtener partículas micrométricas amorfas. Una vez obtenido el polímero, se elimina el analito plantilla liberando las cavidades responsables del reconocimiento selectivo de los analitos.

El principal inconveniente de esta metodología reside en la necesidad de triturar y tamizar el polímero hasta obtener el tamaño de partícula deseado, debido a que en dicho proceso se pierde una gran cantidad de polímero. Por ello, el rendimiento de la polimerización disminuye drásticamente.

**Polimerización por precipitación.** Esta metodología es análoga a la polimerización en bloque pero, en este caso, se emplea una mezcla de

reactivos mucho más diluidos porque se trabaja en exceso de solvente. Como consecuencia se produce una dispersión de partículas esféricas en el seno de la solución, ya que las cadenas poliméricas en formación no logran ocupar el volumen total del disolvente [73]. Entre las principales ventajas de esta técnica se encuentran la obtención de partículas esféricas [74] y la obtención de un gran rendimiento de polimerización al no ser necesario someter el polímero obtenido a las etapas de triturado y tamizado. Por lo general, el tamaño de partícula obtenido mediante esta técnica es de alrededor de  $1\mu\text{m}$  lo que genera problemas cuando se emplea como fase estacionaria en técnicas de separación.

***Polimerización por suspensión.*** En la misma se combinan un medio orgánico hidrofóbico en el que se encuentra la mezcla de polimerización y un medio dispersante orgánico o acuoso inmiscible con el anterior. La ventaja de este procedimiento es que permite controlar el tamaño de las partículas, ya sea por la adición de un estabilizador (polivinilalcohol o líquidos iónicos) o por el control de la velocidad de agitación.

***Polimerización por hinchamiento en etapas.*** Se basa en la síntesis de partículas esféricas de látex en medio acuoso y posterior hinchamiento de las mismas por la formación de microemulsiones mediante la adición de un plastificante (dibutil ftalato). A continuación, se añade la mezcla de prepolimerización que es absorbida por las partículas de látex. Este método produce partículas monodispersas de 2-50  $\mu\text{m}$  de diámetro [75].

El principal inconveniente de esta técnica es la dificultad de ejecución y la incompatibilidad con la obtención de polímeros de impresión no covalente, ya que se emplea agua como dispersante [76].

***Polimerización en partículas de sílica.*** Consiste en la impregnación de partículas de sílice con la mezcla de prepolimerización de modo tal que ocupe el espacio dominado por los mesoporos del material. La polimerización se lleva a cabo térmicamente y se obtiene un material compuesto que adopta el mismo perfil que la sílica inicial (sílica-MIP) [77].

En una etapa posterior, la sílica es redisuelta y eliminada con un reactivo adecuado dando lugar a la formación de partículas esféricas.

La principal dificultad de este método reside en el estricto control del volumen de solución de polimerización empleado, ya que no debe ser superior al volumen total de los poros de la partícula. Un exceso de volumen provocaría la polimerización en el exterior de las partículas de sílica así como la formación de agregados de partículas.

***Polimerización mediante técnicas de injerto.*** Estas técnicas utilizan partículas [78] o membranas [79] como soporte para llevar a cabo la polimerización. Se diferencian dos modalidades:

- Grafting to: en esta modalidad la polimerización se realiza sobre una superficie poniendo en contacto la mezcla de polimerización y la superficie modificada por inmovilización del monómero y se procede a la polimerización, dando lugar a la formación de una capa impresa sobre la superficie. Presenta el inconveniente de la falta de control del espesor de la capa formada.

- Grafting from: surge con la intención de mejorar la transferencia de masa y capacidad de saturación de los polímeros preparados mediante el método anteriormente descrito. En este caso, el compuesto inmovilizado sobre la superficie del material es el iniciador, de forma que el crecimiento de las cadenas ocurre siempre desde la superficie del soporte, lo que permite un mayor control de grosor de la capa de polímero formada.

### **B.3. Aplicaciones de los MIPs**

Algunas de las aplicaciones más usuales de los polímeros impresos se hallan en el campo del análisis clínico, medioambiental y agroalimentario, donde dadas sus características se emplean como fases sensoras o de retención /liberación del analito de interés.

#### **B.3.a. Empleo en técnicas de separación**

Dentro de la química analítica, las técnicas de separación son las que se han visto más beneficiadas con el advenimiento de la técnica de impresión molecular.

El uso de MIPs como fases estacionarias en **cromatografía líquida**, es una de las posibles aplicaciones [80]. Gracias al elevado número de platos teóricos que caracterizan a las técnicas cromatográficas, al utilizar el material impreso como fase estacionaria, la capacidad de reconocimiento del mismo se ve enormemente potenciada. Se ejerce así una fuerte retención sobre la molécula molde cuando esta atraviesa el polímero que permite su separación.

La primera aplicación de los MIPs fue su utilización como fases estacionarias en cromatografía de afinidad, para la resolución de mezclas racémicas. La combinación de la impresión molecular con la cromatografía líquida ha resultado tan eficaz que se han publicado trabajos que permiten la separación de enantiómeros en mezclas racémicas, utilizando como fase estacionaria un polímero impreso con uno de los enantiómeros puros [81].

Existen numerosos trabajos en los que se describen la utilización y caracterización de los polímeros impresos como fases estacionarias en cromatografía [82-84].

Una de las aplicaciones más importante de los MIPs es su empleo como adsorbente selectivo en procesos de **extracción en fase sólida**. Esta aplicación es la que ha adquirido mayor importancia debido a la gran selectividad de los MIPs cuando se comparan con otros adsorbentes como C18, poliestireno-divinilbenceno o las resinas de intercambio iónico.

El procedimiento es muy similar al cromatográfico; consiste en empaquetar al polímero impreso (100-200 mg) dentro de un cartucho de extracción en fase sólida donde, posteriormente se retiene al analito de interés. La técnica se denomina MISPE (molecularly imprinted solid phase extraction). Las etapas del proceso de extracción en fase sólida incluyen el acondicionamiento previo del polímero, la carga de la muestra sobre el polímero, la fijación selectiva del analito en las cavidades del mismo, el lavado de los compuestos de la matriz retenidos de manera inespecífica en el polímero y la elución de los analitos con el disolvente adecuado.

La elección del disolvente más adecuado para cada una de estas etapas debe hacerse basándose no sólo en la solubilidad de los analitos en los distintos disolventes empleados en cada una de las etapas, sino en el tipo de interacción implicada en la unión analito-polímero y en el solvente

empleado durante la polimerización. El disolvente más adecuado para efectuar la carga de la muestra será aquél que favorezca la interacción entre los analitos y el polímero, siendo el porógeno una primera aproximación a considerar. Por el contrario, el disolvente empleado en la elución se seleccionará en función de su facilidad para destruir la interacción específica entre los analitos y el MIP.

El primer ejemplo de MISPE fue descrito en 1994 por el grupo de Sellergren que empleó un MIP selectivo a pentamidina para la preconcentración y limpieza en continuo de muestras de orina enriquecida [85]. Desde entonces son numerosísimos los trabajos publicados de aplicaciones MISPE para la determinación de analitos en diversas muestras medioambientales [86-88], fluidos biológicos [89-91], alimentos [92-94], compuestos farmacéuticos [95], etc.

Otra de las aplicaciones de los polímeros de impresión molecular es su utilización como fases estacionarias en *electrocromatografía capilar*. La misma proporciona separaciones eficaces y selectivas para diversos analitos. Además, la miniaturización del sistema permite trabajar con pequeñas cantidades de molécula molde para preparar el polímero.

No obstante, la adaptación de la tecnología de la impresión molecular a la electrocromatografía plantea una serie de inconvenientes que deben subsanarse. El más importante de todos ellos es la incompatibilidad existente entre el medio necesario para favorecer la interacción específica analito -MIP (generalmente un disolvente apolar) y el medio necesario para sustentar el flujo electroosmótico en electrocromatografía capilar.

La mayoría de las aplicaciones se han centrado en la separación de racémicos [96]; asimismo, existen publicaciones que utilizan polímeros de impresión molecular como fases estacionarias en electrocromatografía capilar para la determinación de aminoácidos, agentes  $\beta$ -bloqueantes, anestésicos, etc [97-100].

### **B.3.b. Empleo en catálisis**

Se ha demostrado que si se obtienen anticuerpos para moléculas similares al estado de transición de una reacción química, pueden ser

empleados como catalizadores de la misma [71]. Basándose en este principio, se diseñaron y sintetizaron materiales impresos con análogos estructurales, de forma que los polímeros obtenidos pueden ser empleados como catalizadores [101]. El primer ejemplo de este tipo de aplicación se llevó a cabo imprimiendo sílice con un análogo estructural del estado de transición para la butanólisis del anhídrido benzoico, resultando un polímero con propiedades catalíticas para dicha reacción. Los polímeros orgánicos también pueden utilizarse con esta finalidad; asimismo, pueden generarse materiales impresos a partir de complejos metálicos polimerizables para la búsqueda de nuevos materiales catalíticos.

### **B.3.c. Empleo en el desarrollo de sensores**

En los últimos años se han desarrollado numerosos sensores basados en el empleo de polímeros de impresión molecular para la detección selectiva de analitos en muestras relativamente complejas y condiciones extremas (altas temperaturas o medios químicos agresivos). La elevada estabilidad de este tipo de materiales es una excelente alternativa al empleo de biomoléculas, generalmente utilizadas como medio de reconocimiento selectivo en la fabricación de sensores. De esta forma, se han desarrollado sensores ópticos [102], electroquímicos [103-105] o piezoeléctricos basados en el empleo de polímeros de impresión molecular para la determinación de pesticidas, productos farmacéuticos, aminoácidos [106-111], etc. Mediante esta técnica se consiguen polímeros sintéticos altamente estables que poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo a través de determinadas cavidades situadas en el interior de la matriz del polímero que son complementarias al analito tanto en la forma como en la posición de los grupos funcionales del mismo.

## **C. SENSORES**

A lo largo de las últimas décadas se ha producido una enorme actividad en el campo de la tecnología de los sensores. Anteriormente, la Química Analítica centró sus esfuerzos en la puesta en marcha de grandes equipos automatizados. En los últimos años se ha ido impulsando otra estrategia en la instrumentación analítica; se trata de pequeños dispositivos que dada su simplicidad, robustez, fiabilidad y bajo costo, son una alternativa al uso de grandes equipos. El hecho de ser dispositivos de reducido tamaño, lo que permite la fabricación de equipos portátiles, unido a que no necesitan el ambiente cuidado del laboratorio, no requieren prácticamente mantenimiento. Además, son fácilmente integrables en sistemas automatizados de pequeña envergadura, lo que los convierte en la solución perfecta a ciertos problemas analíticos que no se podrían solucionar con el uso de otros sistemas más voluminosos, complejos, de alto costo, etc.

Los dispositivos que responden a las características anteriores son los sensores, que son capaces de transformar la magnitud de un proceso químico en una señal física susceptible de ser medida, proporcionando así de forma directa y continua información de un analito presente en su entorno químico [112,113]. Cuando este reconocimiento del analito se produce a través de una reacción química, se puede hablar de sensores químicos.

La necesidad ineludible de extender el campo de aplicación de los sensores químicos hacia áreas tan complejas, desde el punto de vista analítico, como la medicina, la biología, la veterinaria, la biotecnología o el medio ambiente, ha contribuido al desarrollo de nuevos dispositivos de reconocimiento para especies moleculares más selectivos que los actualmente existentes.

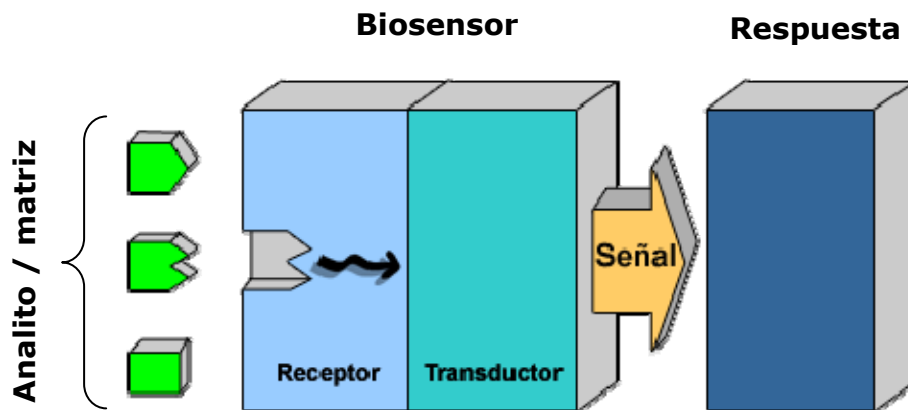
Este es el caso de los biosensores, los cuales han atraído una considerable atención debido a su extraordinaria sensibilidad y especificidad. Los mismos incorporan un elemento biológicamente activo (u otro artificial que desempeñe sus mismas funciones) capaz de reconocer a la especie a analizar por medio de alguna reacción bioquímica [114,116].

También aquí tendrán cabida los sensores biomiméticos, que a pesar de no incorporar en su mecanismo de reconocimiento ningún tipo de reacción bioquímica, son capaces de detectar y cuantificar compuestos de manera selectiva por un mecanismo análogo a una reacción bioquímica.

Un biosensor sensible a una determinada especie química, consta básicamente de dos partes (figura 4) [117]:

a) Una zona (bio)química, llamada también fase sensora, capaz de interactuar selectivamente con la especie de interés, dando como resultado un cambio en las propiedades físicas o químicas (calor, transferencia de electrones, absorción o emisión de luz, etc.) del sistema, cuya magnitud estará relacionada con la concentración de la especie química a analizar.

b) Un transductor físico o zona de medida en la que este cambio es "transformado" en una señal física medible que se registra mediante sistemas electrónicos adecuados.



**Figura 4.** Esquema de un biosensor

En los biosensores, la interacción selectiva con la molécula a analizar se consigue mediante la utilización de materiales biológicamente activos, tales como enzimas, anticuerpos o antígenos, etc. Sin embargo, el uso de materiales biológicos en la preparación de estos dispositivos acarrea problemas operacionales, como por ejemplo su baja estabilidad a corto y mediano plazo, desnaturalización irreversible e inexistencia en el mercado



de componentes biológicos, capaces de reconocer selectivamente a un determinado tipo de sustancia. Parte de estos problemas pueden ser solucionados mediante el uso de fases sensoras biomiméticas, en las que el componente biológico es sustituido por un polímero sintético que se elabora con características predeterminadas para reconocer selectivamente a una molécula específica. La técnica de la impresión molecular, ofrece grandes posibilidades para el desarrollo de este tipo de polímeros selectivos y puede proporcionar una alternativa válida para el uso de estas fases sensoras.

### C.1. Sensores ópticos

Según el cambio físico-químico transformado (eléctrico, óptico, de masa, etc.), los sensores pueden ser clasificados en sensores electroquímicos, ópticos, piezoeletrónicos, etc.

Específicamente, *sensores ópticos* son aquellos que responden a un cambio en una propiedad óptica (absorción, reflectancia, fluorescencia, fosforescencia, quimioluminiscencia, bioluminiscencia, etc.) que se produce como consecuencia de una variación en la concentración de la especie que se pretende determinar [118-122]. Dentro de los sensores ópticos se puede hacer una clasificación dependiendo del diseño externo:

- a) **Optosensores:** también llamados de celda de flujo, son aquellos en los que el sólido ópticamente activo (fase sensora) se encuentra empaquetado en el interior de una celda de flujo que a su vez suele estar en el interior del compartimiento de celdas del sistema de detección (espectrofotómetro, fluorímetro, fosforímetro, etc.); es un diseño que implica su utilización en un sistema en flujo [123].
- b) **Optodos:** también llamados de tipo *sonda*, están constituidos por una o varias fibras ópticas de modo que la zona de reconocimiento se halla inmovilizada en el extremo del haz de fibras ópticas [124]. Este modelo se puede emplear tanto en discontinuo como en flujo.

- c) **Optrodos:** mientras que en los dos diseños anteriores se emplea la radiación eletromagnética como medio para provocar un cambio óptico en el sistema, los optrodos combinan un sistema electroquímico que permite la excitación de la fase sensora, con una fibra óptica que recoge y transporta hasta el sistema de detección el cambio de la señal luminosa producida como consecuencia de la presencia o ausencia del analito en esa fase sensora.

### **C.1.a. Ventajas de los sensores ópticos**

Las fases sensoras molecularmente impresas se emplean, generalmente, en el desarrollo de sensores ópticos en flujo. Las principales ventajas que ofrecen los sensores ópticos en flujo frente a otro tipo de sensores son las siguientes [125,126]:

- No se necesita alcanzar el equilibrio, por lo que se consigue un descenso importante en el tiempo de análisis, pudiendo llegar a hacer el análisis en tiempo real.
- El tipo de señales obtenido con estos sistemas en flujo es en forma de picos transientes que suelen ser muy reproducibles.
- Los volúmenes de muestra necesarios son bastante pequeños.
- Las señales ópticas no están expuestas a interferencias de tipo eléctrico, no necesitan una señal de referencia y el diseño de estos sensores suele ser sencillo y de bajo costo.



## **II**

---

## **HERRAMIENTAS ANALÍTICAS**

## **A. REACTIVOS Y DISOLUCIONES**

### **A.1. Utilizados en el desarrollo del estudio fluorescimétrico de la interacción entre benzodiazepinas y seroalbúmina bovina.**

La seroalbúmina bovina, SAB (Merck), fue disuelta diariamente en una solución reguladora Tris-HCl 0,1M (pH=7,4) para obtener una disolución madre de concentración  $2,5 \times 10^{-4}$  M.

Las disoluciones patrones de benzodiazepinas fueron preparadas disolviendo las drogas (lorazepam, oxazepam y bromazepam; donaciones del laboratorio Bagó) en etanol. Dichas disoluciones (lorazepam  $3,2 \times 10^{-3}$  M, oxazepam  $4,6 \times 10^{-3}$  M y bromazepam  $3,1 \times 10^{-3}$  M) resultaron estables por un tiempo mayor a tres meses manteniéndolas refrigeradas a 4°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución de las soluciones patrones anteriormente mencionadas con solución reguladora Tris-HCl.

La solución reguladora de pH=7,4 fue preparada disolviendo 3,0 g de tris(hidroximetil)aminometano (Carlo Erba) y 4,5 g de NaCl (Merck) en agua, adicionando luego 25 ml de HCl 1M (Merck) y diluyendo la mezcla a 500 ml con agua.

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico y las disoluciones fueron preparadas con agua bidestilada.

### **A.2. Utilizados en la síntesis de polímeros impresos con el derivado de hidrólisis de oxazepam.**

Como monómeros funcionales se utilizaron ácido metacrílico, MAA (Fluka) y estireno (Merck); el MAA fue destilado en vacío (78 mm Hg, 78 °C) para remover los estabilizadores. Como agente entrecruzante se utilizó etilenglicoldimetacrilato, EGDMA (Aldrich), el cual fue purificado por extracción con NaOH 0,1 N, secado con sulfato de sodio anhidro y pasado a través de una columna de alúmina activada. Como iniciador radicalario se utilizó al azo-bis, isobutironitrilo, AIBN (Aldrich), previamente recristalizado con metanol.

Como disolventes se utilizaron etanol absoluto (Sintorgan) y metanol para HPLC (Merck).

Se utilizaron numerosas disoluciones patrones de oxazepam y 2-amino,5-clorobenzofenona (Aldrich) en etanol absoluto (Sintorgan), metanol (Merck) y cloroformo (Merck); la preparación de las mismas se menciona en el desarrollo experimental.

### **A.3. Utilizados en el sistema de medida en flujo**

Para la evaluación en flujo se utilizó hexano uso espectroscópico (Matheson Coleman & Bell) e isopropanol (Anedra).

## **B. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA**

Todos los espectros de fluorescencia y fosforescencia fueron registrados con un espectrofotofluorómetro Perkin-Elmer LS-50B (Beaconsfield, Inglaterra) provisto de una lámpara pulsada de xenón como fuente de excitación (ancho de pulso  $<10 \mu\text{s}$ , 60 Hz) y un fotomultiplicador R928. El instrumento se encuentra conectado a una PC para el almacenamiento y tratamiento de datos a través del software FL Winlab. Las soluciones se mantuvieron a temperatura constante con un criostato Lauda K2R (Alemania).

Los espectros de absorción fueron medidos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 (Japón).

Las medidas realizadas por cromatografía gaseosa fueron llevadas a cabo utilizando un cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC-2014 (Japón) provisto de un inyector automático AOC-20i y detector FID. Se utilizó una columna capilar Restex Rtx-65TG.



### **III**

---

## **EXPERIMENTAL - RESULTADOS**



## **CAPÍTULO 1**

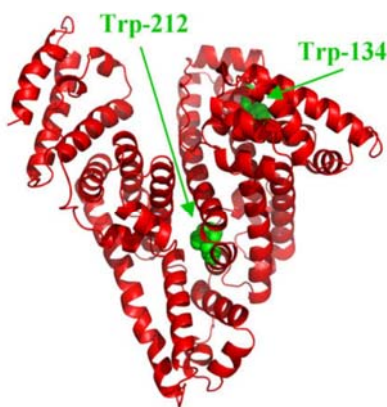
**“Estudio fluorescimétrico de la interacción entre  
benzodiazepinas y seroalbúmina bovina”**



La seroalbúmina es la proteína más abundante en plasma en humanos y otros mamíferos, la misma se encarga de transportar sustancias de naturaleza química muy diversa, como ácidos grasos, aminoácidos, esteroides, metales (como el calcio), y numerosos fármacos, facilitando la transferencia de muchas de ellas desde la circulación sanguínea a órganos como el hígado, el riñón, el intestino y el cerebro [127]. Su principal función es regular la presión coloidosmótica de la sangre, y presenta una gran afinidad por pequeñas moléculas hidrofóbicas cargadas negativamente [128, 129].

Las seroalbúminas bovina (SAB) y humana (SAH) muestran aproximadamente un 76% de analogía en su secuencia, y sus estructuras 3D son similares. Para llevar a cabo el presente estudio se seleccionó a la seroalbúmina bovina debido a su bajo costo. No obstante las seroalbúminas bovina y humana son proteínas homólogas.

La estructura terciaria de la seroalbúmina bovina está formada por tres dominios homólogos (I, II y III), cada uno de los cuales está dividido en nueve loops por 17 puentes disulfuro. Cada dominio es el producto de dos subdominios (IA, IB, etc.). A diferencia de la seroalbúmina humana, que posee un solo residuo de triptofano, la seroalbúmina bovina cuenta en su estructura con dos residuos de triptofano [130]: Trp-134 en el primer dominio y Trp-212 en el segundo (ver figura 5). El Trp-212 está localizado en un bolsillo hidrofóbico de la proteína y el Trp-134 está ubicado sobre la superficie de la molécula [131].



**Figura 5.** Estructura tridimensional de la seroalbúmina bovina (residuos de triptofano en color verde).

Varias drogas y otras biomoléculas se unen de manera reversible a las albúminas y otros componentes del suero que luego funcionan como transportadores. La seroalbúmina se une de esta manera a las benzodiazepinas.

## **A. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LAS BENZODIAZEPINAS**

### **A.1. Medidas de absorción UV-visible**

#### **A.1.a. Fundamentos**

Cuando la energía radiante electromagnética atraviesa una muestra, ciertas frecuencias pueden eliminarse selectivamente por *absorción*, un proceso mediante el cual la energía electromagnética se transfiere a los átomos, iones o moléculas que componen la muestra. La absorción provoca que estas especies pasen de un estado normal a temperatura ambiente, o estado fundamental, a uno o más estados excitados de energía superior [132].

Existen dos requisitos generales para que esto ocurra. El primer requisito es la presencia de algún mecanismo por el cual el campo de energía eléctrica o magnética interactúe con el analito. Para la radiación visible o ultravioleta, esta interacción afecta a la energía electrónica de los electrones de valencia.

El segundo requisito es que para que se produzca la absorción de la energía radiante, la energía de los fotones excitados debe coincidir exactamente con la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de las especies absorbentes [133]. Como estas diferencias de energía son características de cada especie, el estudio de las frecuencias de la energía radiante absorbida proporciona un medio para caracterizar los componentes de una muestra.

Cuando una molécula o ión absorbe energía radiante ultravioleta o visible, sufre un cambio en la configuración de sus electrones de valencia. Los electrones que contribuyen a la absorción en una molécula orgánica como las benzodiazepinas y SAB son:

(1) aquellos que participan directamente en la formación del enlace entre átomos y, por lo tanto, se asocian con más de un átomo;

(2) electrones no enlazantes, que no participan en ningún enlace y están en gran parte localizados alrededor de átomos como oxígeno, halógenos y nitrógeno.

Existen cuatro tipos de transiciones posibles entre niveles de energía que explican los espectros UV-vis (tabla 3).

De esas transiciones, las más importantes son  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$ , porque involucran grupos funcionales característicos del analito y longitudes de onda que son fácilmente accesibles con instrumentación sencilla.

Los espectros electrónicos de moléculas orgánicas son, en general, complejos porque la superposición de las transiciones vibracionales sobre las transiciones electrónicas conduce a una combinación de líneas solapadas; el resultado es una banda de absorción ancha que parece ser continua. La determinación del máximo de absorción es, por tanto, difícil.

Transición	Intervalo de $\lambda$ (nm)	Ejemplos
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	< 200	C-C, C-H
$n \rightarrow \sigma^*$	160 - 260	H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> OH, CH <sub>3</sub> Cl
$\pi \rightarrow \pi^*$	200 - 500	C=C, C=O, C=N
$n \rightarrow \pi^*$	250 - 600	C=O, C=N, N=N, N=O

**Tabla 3.** Transiciones electrónicas que involucran orbitales moleculares  $\sigma$ ,  $n$  y  $\pi$ .

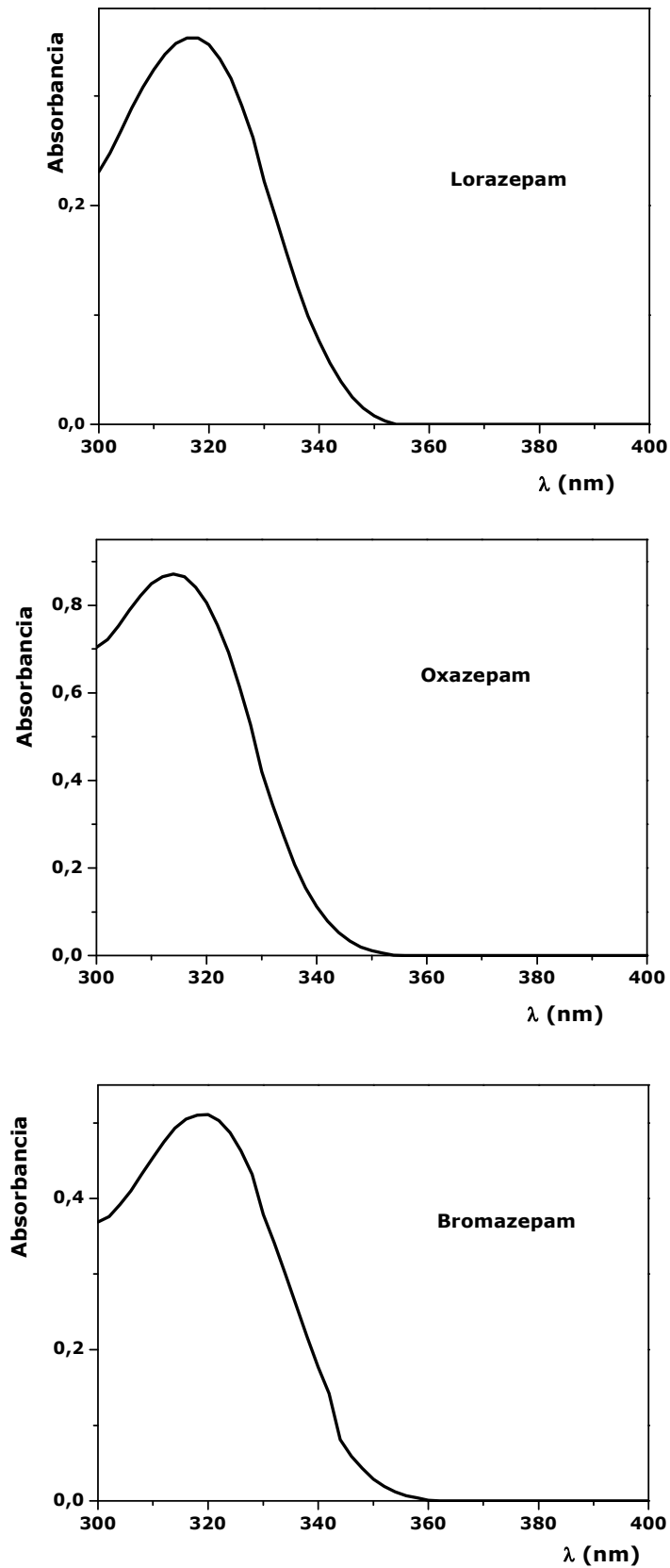
### A.1.b. Espectros de absorción

Todos los espectros de absorción fueron registrados con un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 (Japón), con un ancho de banda de 2 nm.

Las disoluciones a ser analizadas fueron dejadas en reposo por un mínimo de diez minutos previos a las mediciones. Se utilizaron blancos apropiados para corregir las señales de fondo de absorción.

#### • Absorción de benzodiazepinas

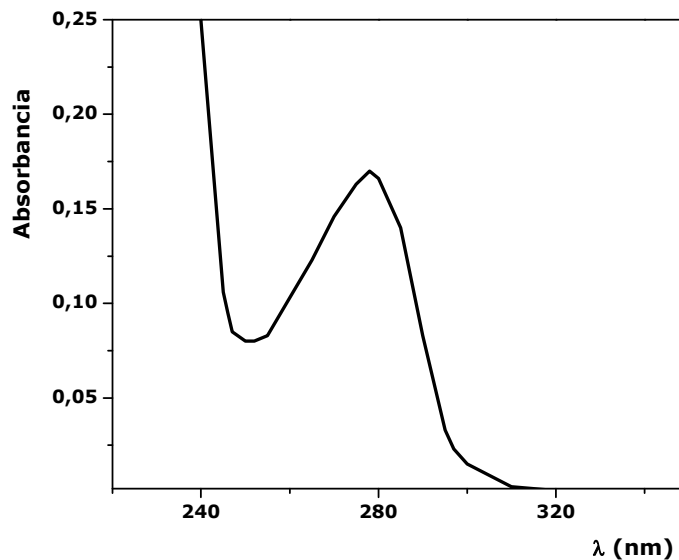
Con el fin de caracterizar a las benzodiazepinas en estudio, se registraron los espectros de absorción de disoluciones  $2,5 \times 10^{-4}$  M de lorazepam, oxazepam y bromazepam, las cuales presentan máximos de absorción a 317, 314 y 319 nm, respectivamente (ver figura 6).



**Figura 6.** Espectros de absorción de lorazepam, oxazepam y bromazepam.

### • Absorción de seroalbúmina bovina

En la siguiente figura se presenta el espectro de absorción de una disolución  $1 \times 10^{-4}$  M de SAB. La absorción en el intervalo comprendido entre 260-310 nm se debe a los residuos de triptofano, tirosina y fenilalanina.



**Figura 7.** Espectro de absorción de SAB.

## A.2. Medidas de fluorescencia

### A.2.a. Fundamentos

La fluorescencia tiene lugar en sistemas químicos gaseosos, líquidos y sólidos, tanto sencillos como complejos, aunque en este caso se tratará únicamente el caso de sistemas líquidos.

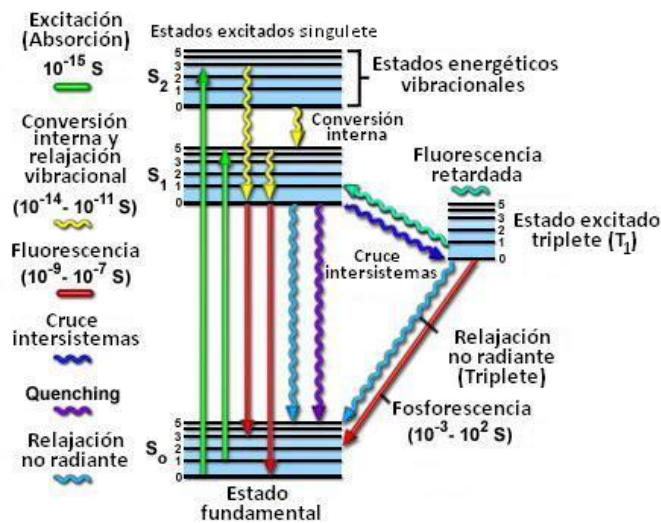
La figura 8 muestra un diagrama de niveles de energía para una molécula fotoluminiscente característica. La línea horizontal gruesa que se encuentra en la parte inferior de la figura representa la energía del estado fundamental de la molécula que habitualmente es un estado singulete y se designa  $S_0$ . A temperatura ambiente, este estado representa la energía de prácticamente todas las moléculas en disolución.

Las líneas gruesas superiores representan los niveles de energía de los estados vibracionales fundamentales de dos estados electrónicos excitados. Las dos líneas situadas a la izquierda representan los estados electrónicos



singulete y la línea de la derecha representa la energía del primer estado electrónico triplete (T). A cada uno de los estados electrónicos se le asocian numerosos niveles de energía vibracionales.

Cuando una molécula absorbe energía radiante (líneas verdes) se excita a niveles de energía superiores, a cualquiera de los diversos estados vibracionales en  $S_1$  y  $S_2$  y no al estado triplete ya que las transiciones singulete-triplete poseen una baja probabilidad de ocurrir y se las denomina "transición prohibida".



**Figura 8.** Diagrama de energía de un sistema fotoluminiscente.

Existen varios mecanismos de desactivación por los cuales la molécula puede regresar a su estado fundamental y este hecho se produce por combinación de los mismos:

- Relajación no radiante:
  - a) Relajación vibracional, entre niveles vibracionales (líneas amarillas)
  - b) Conversión interna, entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico (líneas amarillas)
  - c) "Quenching", o desactivación de la fluorescencia (línea morada y azul claro, respectivamente)
  - d) Cruce intersistemas, entre niveles de diferente multiplicidad (línea azul oscura)

- Relajación radiante:
  - a) Fluorescencia (línea roja)
  - b) Fosforescencia (línea roja)

De estos seis mecanismos, únicamente la fosforescencia y la fluorescencia implican re-emisión de energía radiante absorbida.

En resumen, la fluorescencia es una re-emisión de energía absorbida o desactivación de una molécula excitada que tiene lugar en su mayor parte mediante un mecanismo radiativo, que implica una transición singulete-singulete desde el nivel vibracional más bajo del estado energético excitado a cualquiera de los niveles vibracionales del estado energético fundamental, así hasta regresar de nuevo al menos energético de ellos, o fundamental. Esta emisión de energía fluorescente puede ser medida y empleada con fines cualitativos (identificando la molécula en disolución a través de la longitud de onda a la que absorbe energía radiante y a la que la emite) y con fines cuantitativos (puede determinarse mediante un calibrado previo, la cantidad de moléculas que hay en disolución).

### **A.2.b. Espectros de excitación y de emisión**

Los espectros de excitación se obtienen midiendo la intensidad de emisión de fluorescencia a una longitud de onda fija mientras se varía la longitud de onda de excitación. Los espectros de emisión de fluorescencia, suponen la excitación a una longitud de onda fija mientras se registra la intensidad de emisión en función de la longitud de onda.

Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos en un espectrofotofluorómetro Perkin Elmer LS 50B (Beaconsfield, Inglaterra), equipado con lámpara de xenón pulsante y tubo fotomultiplicador R928.

Las medidas fueron realizadas utilizando celdas de cuarzo de 10 mm de camino óptico y con anchos medios de banda de 10 y 2,5 nm para los monocromadores de excitación y emisión respectivamente.

Las soluciones se mantuvieron a temperatura constante con un criostato Lauda K2R (Alemania).

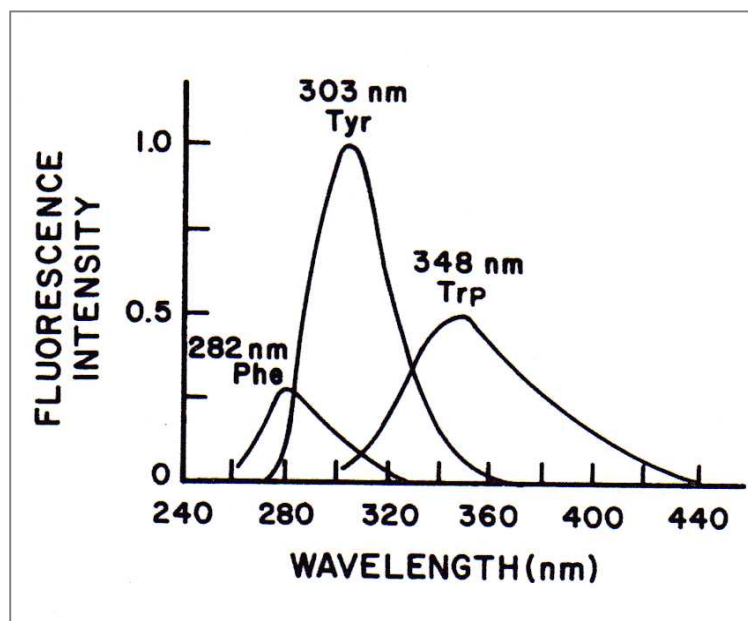
### • Fluorescencia de la seroalbúmina bovina

Las proteínas presentan fluorescencia intrínseca debido a la presencia de aminoácidos tales como triptofano, tirosina y fenilalanina, los cuales emiten en solución acuosa con máximos en 348, 303 y 282 nm, respectivamente (ver figura 9) [134].

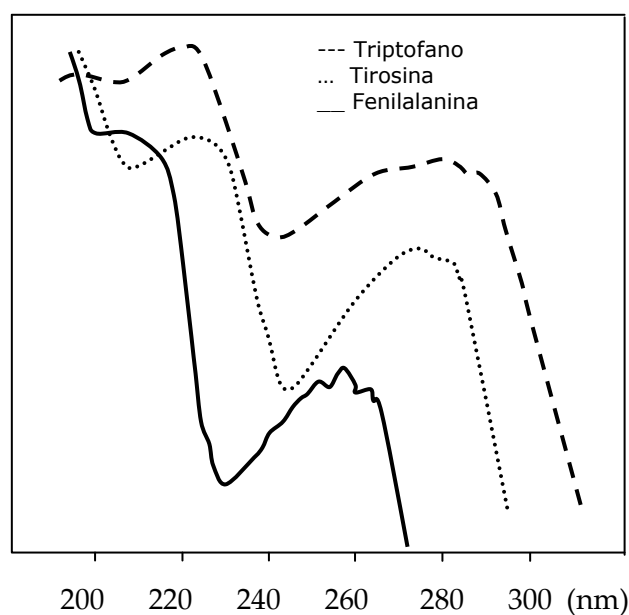
La eficiencia cuántica de la fenilalanina es pequeña, de un valor cercano a 0,03; por lo tanto raramente se observa y la emisión proviene fundamentalmente de los residuos de tirosina y triptofano.

Tal como puede verse en la figura 10, si se excita a 280 nm se obtiene la emisión de fluorescencia de los residuos de tirosina y triptofano.

A longitudes de onda mayores que 295 nm la absorción de la SAB se debe sólo a los residuos de triptofano; su respectiva emisión de fluorescencia puede obtenerse en forma selectiva excitando a longitudes de onda comprendidas entre 295-305 nm.

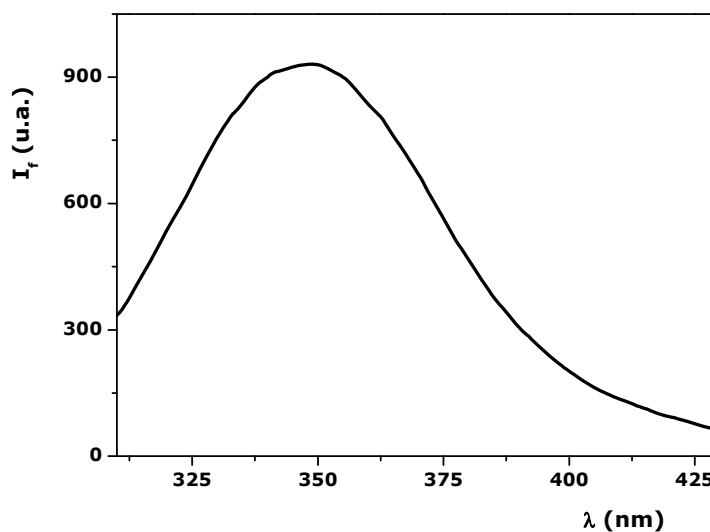


**Figura 9.** Espectros de emisión de fluorescencia de triptofano, tirosina y fenilalanina.



**Figura 10.** Espectros de excitación de fluorescencia de triptofano, tirosina y fenilalanina.

Con la finalidad de obtener los espectros de emisión de fluorescencia correspondiente sólo a los residuos de triptofano, las disoluciones de SAB fueron excitadas a 295 nm. La figura siguiente muestra el espectro de emisión de la SAB; la cual presenta un máximo de emisión a 348 nm.



**Figura 11.** Espectro de emisión de fluorescencia de la SAB, con excitación a 295 nm.

## **B. ESTUDIO DEL QUENCHING DE FLUORESCENCIA DE LA SAB**

### **B.1. Fundamentos**

En muestras biológicas, como las involucradas en este estudio, el fluoróforo se encuentra en disolución y puede interactuar con otras moléculas. Como consecuencia de esta interacción puede producirse una pérdida de emisión fluorescente; tal disminución en la intensidad se denomina *quenching de fluorescencia*.

Una amplia variedad de interacciones moleculares pueden generar la desactivación: reacciones de estado excitado, reorganizaciones moleculares, transferencia de energía, formación de complejos y colisiones entre moléculas.

El quenching de la fluorescencia ha sido ampliamente estudiado como fenómeno fundamental y como fuente de información de sistemas bioquímicos. Las aplicaciones biológicas del quenching se deben al rol de las interacciones moleculares en dicho proceso. Los dos tipos de desactivación existentes (estático y dinámico) requieren contacto molecular entre el fluoróforo y el desactivante.

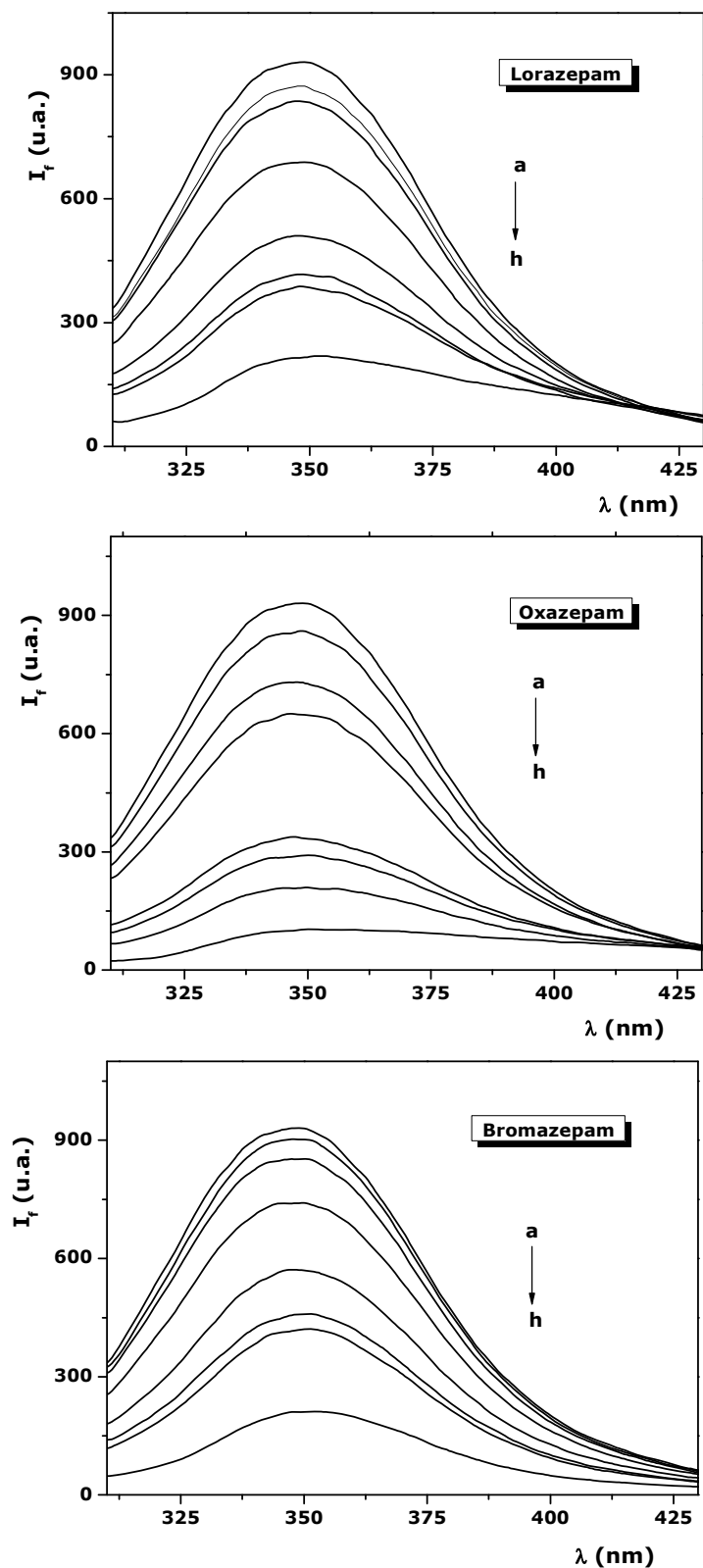
En la sección B.3. se exponen con mayor detalle los mecanismos de quenching.

### **B.2. Medidas del quenching de BSA por benzodiazepinas**

Se llevó a cabo un estudio del "quenching" de la fluorescencia de la SAB, registrando sus espectros de emisión (con excitación a 295 nm) de disoluciones conteniendo una cantidad fija de SAB y diferentes concentraciones de las drogas en estudio.

Para ello se tomaron distintas alícuotas de la solución madre de cada una de las benzodiazepinas y se transfirieron a matraces de 10,00 ml conteniendo un volumen fijo de solución patrón de SAB; luego fueron llevados a volumen por agregado de la disolución reguladora.

La adición de concentraciones crecientes de benzodiazepinas sobre una concentración fija de seroalbúmina bovina causa una progresiva reducción en la intensidad de fluorescencia tal como se observa en la figura 12.



**Figura 12.** Quenching de la fluorescencia de la SAB por efecto de las BDZs;  $\lambda_{em} = 295$  nm;  $[BSA] = 1.0 \times 10^{-5}$  M;  $[BDZ] \times 10^5$  M: a-h: 0; 0,6; 0,9; 2,0; 6,0; 8,0; 10,0; 20,0, respectivamente.

No se observa un desplazamiento significativo en la longitud de onda de emisión de la SAB, lo cual sugiere la existencia de una interacción entre las drogas y la SAB que produce la desactivación de la fluorescencia intrínseca de la proteína.

Resta establecer el mecanismo de quenching para corroborar que los cambios en la fluorescencia están relacionados con un fenómeno de unión.

### B.3. Determinación del mecanismo de quenching

Existen dos tipos de quenching que caracterizan el mecanismo de interacción entre desactivantes y macromoléculas: quenching estático y quenching dinámico.

En el quenching dinámico o colisional el desactivante difunde hacia el fluoróforo (durante el tiempo de vida del estado excitado del mismo) y, luego del contacto, el fluoróforo retorna a su estado fundamental sin emisión de un fotón.

El quenching estático o asociativo se produce como resultado de la formación de un complejo no fluorescente entre el fluoróforo y el desactivante. Cuando el complejo absorbe energía, retorna de inmediato al estado fundamental sin emisión de un fotón.

El proceso de quenching se describe a través de la ecuación de Stern-Volmer [135]:

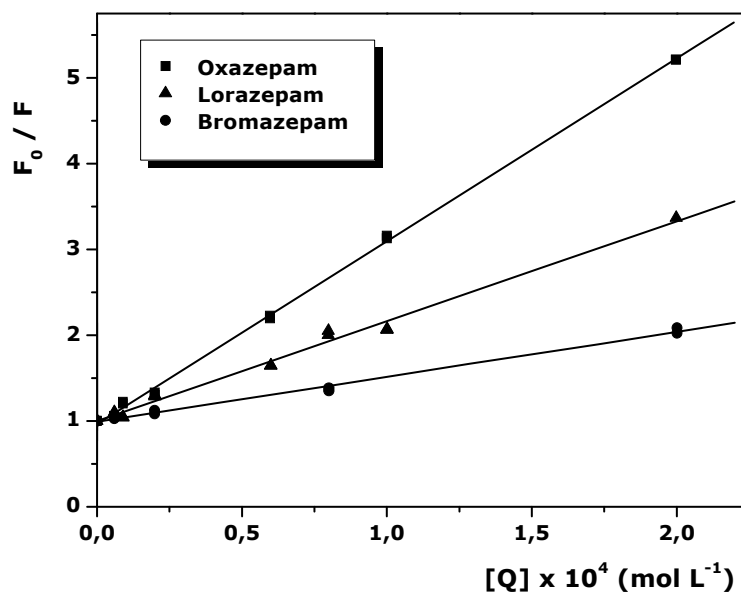
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

donde  $F_0$  y  $F$  representan las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del desactivante respectivamente,  $K_q$  es la constante de quenching bimolecular,  $K_{SV}$  es la constante de quenching de Stern-Volmer,  $\tau_0$  es el tiempo de vida promedio de SAB en ausencia del desactivante y  $[Q]$  es la concentración del desactivante.

El quenching estático puede distinguirse del dinámico a través de la constante de quenching  $K_q$ . Por lo tanto, se aplicó la ecuación de Stern-Volmer para determinar  $K_{SV}$  por regresión lineal de un gráfico de  $F_0/F$  vs  $[Q]$ .

De acuerdo a la literatura, [136,137] para quenching dinámico, el valor máximo de  $K_q$  de varios desactivantes con los biopolímeros es  $2,0 \times 10^{10} \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$  y el tiempo de vida de fluorescencia de biopolímeros es  $10^{-8} \text{ s}$  [13].

En la figura 13 se presentan los gráficos de Stern-Volmer para los sistemas droga-SAB. Los valores de  $K_{SV}$  y  $K_q (=K_{SV}/\tau_0)$  a  $24^\circ\text{C}$  obtenidos de los gráficos correspondientes se muestran en la tabla 4.



**Figura 13.** Gráficos de Stern-Volmer para el quenching de la SAB por benzodiazepinas.

Droga	LOR	OXA	BRO
$K_{SV} \text{ (L mol}^{-1}\text{)}$	$1,16 \times 10^4$	$2,13 \times 10^4$	$5,24 \times 10^3$
$K_q \text{ (L mol}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$	$1,16 \times 10^{12}$	$2,13 \times 10^{12}$	$5,24 \times 10^{11}$
$r^a$	0,9947	0,9995	0,9906

$r^a$  coeficiente de correlación lineal.

**Tabla 4.** Constantes de quenching para la interacción de benzodiazepinas con SAB

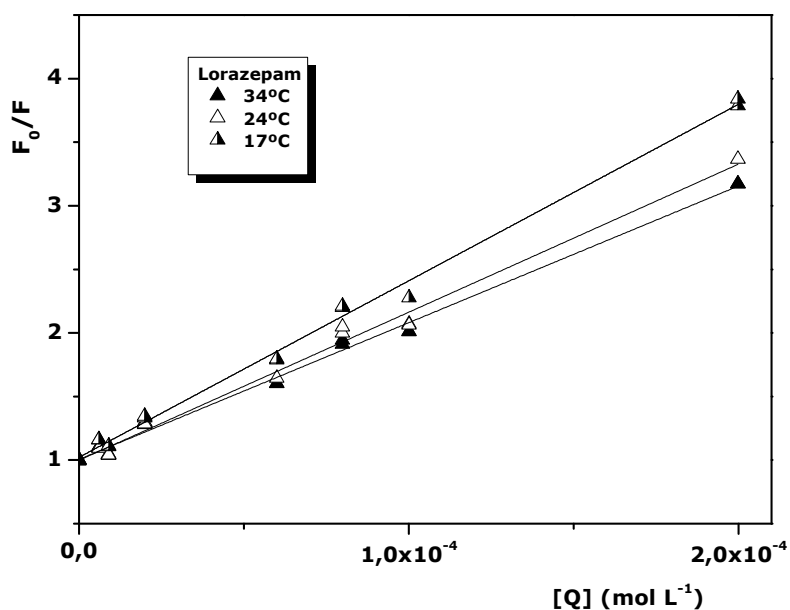
Todos los valores de  $K_q$  hallados son mayores que  $2,0 \times 10^{10} \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Esto sugiere que la desactivación de la fluorescencia ocurre a causa de una interacción específica entre SAB y las benzodiazepinas; el mecanismo de quenching surge principalmente de la formación de complejos, mientras que



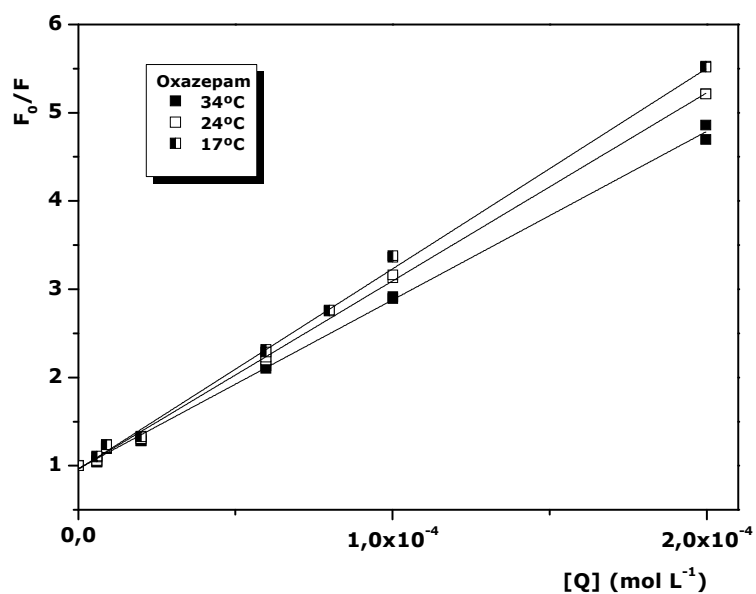
el quenching producido por colisiones es insignificante en el intervalo de concentraciones estudiadas [138].

Otra de las maneras de diferenciar entre quenching estático y quenching dinámico es comparar las constantes obtenidas a distintas temperaturas. El quenching dinámico depende de la difusión. Debido a que la elevación de la temperatura da como resultado un aumento en los coeficientes de difusión se espera que la constante de quenching aumente con el incremento de la temperatura. Asimismo, dicho aumento disminuye la estabilidad de los complejos y por ende provoca una disminución en la constante de quenching estático.

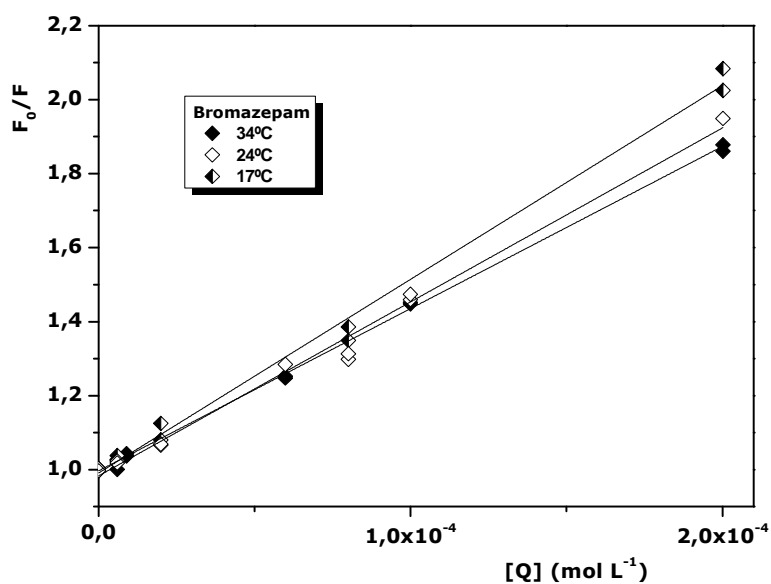
La figura 14 muestra las gráficas de la ecuación de Stern-Volmer obtenidas a tres temperaturas.



**Figura 14a.** Gráficos de Stern-Volmer para el quenching de la SAB por lorazepam a tres temperaturas.



**Figura 14b.** Gráficos de Stern-Volmer para el quenching de la SAB por oxazepam a tres temperaturas.



**Figura 14c.** Gráfico de Stern-Volmer para el quenching de la SAB por bromazepam a tres temperaturas.

En todos los casos se observa una disminución de la constante de quenching con el aumento de la temperatura; esto confirma el mecanismo de quenching estático.

## **C. CARACTERIZACIÓN DEL FENÓMENO DE ASOCIACIÓN**

### **C.1. Cálculo de la constante de unión entre benzodiazepinas y SAB**

Cuando se trata de un mecanismo de quenching estático, la relación entre la intensidad de quenching de fluorescencia y la concentración del desactivante puede ser descrita por la ecuación modificada de Stern-Volmer.

Si hay  $n$  sitios de unión para desactivantes (Q) por proteína (SAB), la reacción de quenching es:



la constante de unión para la interacción proteína-desactivante ( $K_b$ ) está definida por:

$$K_b = \frac{[Q_nSAB]}{[Q]^n[SAB]} \quad (3)$$

donde  $[Q]$  y  $[SAB]$  son las concentraciones molares de desactivante y proteína no unidas, respectivamente.

Si la cantidad inicial de biomoléculas es  $SAB_0$ , entonces,

$$[Q_nSAB] = [SAB_0] - [SAB] \quad (4)$$

la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de proteínas [139] como se describe por:

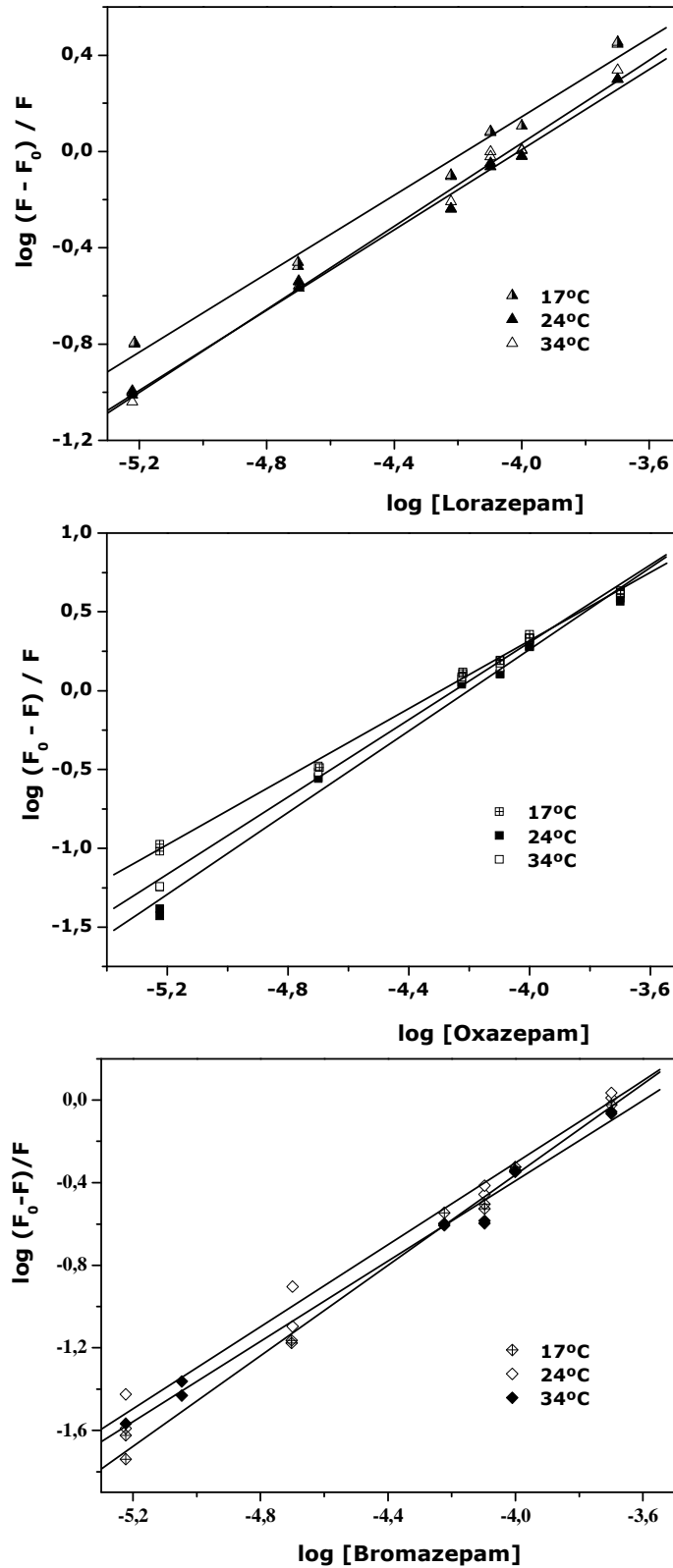
$$\frac{[SAB]}{[SAB_0]} = \frac{F}{F_0} \quad (5)$$

luego,

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (6)$$

por consiguiente, los datos de intensidad de fluorescencia pueden ser utilizados para obtener la constante de unión y el número de sitios de unión.

Los valores de  $K_b$  y  $n$  a 17°C, 24°C y 34°C se obtuvieron a partir de la curva de regresión doble logarítmica (figura 15).



**Figura 15.** Gráficos doble logarítmicos del efecto que producen: lorazepam, oxazepam y bromazepam sobre la fluorescencia de SAB a 17°C, 24°C y 34°C.

La fracción de sitios accesibles al fluoróforo ( $f$ ) puede calcularse utilizando la siguiente ecuación [140]:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (7)$$

$\Delta F$  es la diferencia de intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia del desactivante a concentración  $[Q]$ ,  $f_a$  es la fracción inicial de sitios de fluorescencia los cuales son accesibles al desactivante y  $K_a$  es la constante efectiva de "quenching" para los fluoróforos accesibles.

Esta ecuación deriva de la de Stern-Volmer y se aplica a proteínas considerando que pueden existir sitios que están accesibles al desactivante y otros que no lo están. En esa situación, La fluorescencia total que presenta la proteína puede dividirse en:

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} \quad (8)$$

En presencia del desactivante la intensidad fluorescencia correspondiente a la fracción de sitios accesibles decae de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer,

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K[Q]} + F_{0b} \quad (9)$$

donde  $K$  es la constante de "quenching" de Stern-Volmer de la fracción de sitios accesibles.

Restando a la expresión para  $F$  la correspondiente a  $F_0$  y reordenando se llega a la ecuación mencionada al comienzo.

La dependencia de  $F_0/F$  con el valor recíproco de la concentración del desactivante  $[Q]^{-1}$  resulta lineal.

Los valores de  $K_b$ ,  $n$  y  $f_a$  obtenidos de esta manera a 17°C, 24°C y 34°C se presentan en la tabla 5.

Droga	17°C			24°C			34°C		
	$K_b$ (mol L <sup>-1</sup> )	n	f <sub>a</sub>	$K_b$ (mol L <sup>-1</sup> )	n	f <sub>a</sub>	$K_b$ (mol L <sup>-1</sup> )	n	f <sub>a</sub>
<b>LOR</b>	3,75 x 10 <sup>3</sup>	0,81	0,85	3,06 x 10 <sup>3</sup>	0,86	1,36	2,19 x 10 <sup>3</sup>	0,83	0,69
<b>OXA</b>	1,17 x 10 <sup>5</sup>	1,08	1,13	1,63 x 10 <sup>5</sup>	1,23	1,20	2,77 x 10 <sup>5</sup>	1,29	1,24
<b>BRO</b>	1,06 x 10 <sup>4</sup>	1,09	0,86	4,68 x 10 <sup>3</sup>	0,99	0,82	3,16 x 10 <sup>3</sup>	0,97	0,72

**Tabla 5.** Constantes y sitios de unión a tres temperaturas para los sistemas benzodiazepinas-SAB.

Los valores de n, cercanos a 1, indican la existencia de un único sitio de unión en SAB para las drogas en estudio.

Para las interacciones de lorazepam y bromazepam con la SAB, las constantes de unión disminuyen con el incremento de la temperatura; sin embargo, para la interacción entre oxazepam y SAB ocurre lo contrario (la constante de unión aumenta con la elevación de la temperatura). De este análisis se desprende que la interacción lorazepam/bromazepam-SAB ocurre de manera exotérmica y el proceso de interacción oxazepam-SAB es endotérmico.

## C.2. Determinación de los modos de unión

La fuerza de unión entre una molécula pequeña (ligando) y una macromolécula (receptor) en agua está determinada por el tipo de interacción que ocurra, que incluyen formación de puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas [141].

Los parámetros termodinámicos, variación de entalpía ( $\Delta H$ ) y de entropía ( $\Delta S$ ), para la reacción de unión, resultan una evidencia para confirmar los modos de unión. Valores de  $\Delta H > 0$  y  $\Delta S > 0$  implican una interacción hidrofóbica;  $\Delta H < 0$  y  $\Delta S < 0$  reflejan la presencia de fuerzas de van der Waals o la formación de enlaces por puentes de hidrógeno; y  $\Delta H \approx 0$  con  $\Delta S > 0$  sugiere una fuerza electrostática [142].

Con ese propósito, se estudió la dependencia de la constante de unión con la temperatura. Se seleccionaron tres temperaturas diferentes (17, 24 y

34 °C) bajo las cuales la SAB no sufre ningún tipo de degradación estructural.

Los parámetros termodinámicos pueden calcularse en base a la ecuación de van 't Hoff:

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (10)$$

donde K es la constante de unión a la temperatura correspondiente y R es la constante universal de los gases. La variación de entalpía ( $\Delta H$ ) se calcula a partir de la gráfica de  $\ln K$  versus  $1/T$ . El cambio en la energía libre ( $\Delta G$ ) y la variación de entropía ( $\Delta S$ ) pueden estimarse utilizando:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (11)$$

Los resultados se presentan en la tabla 6.

<b>Droga</b>	<b><math>\Delta G</math> <sup>17°C</sup> (kj mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\Delta G</math> <sup>24°C</sup> (kj mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\Delta G</math> <sup>34°C</sup> (kj mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\Delta H</math> (kj mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\Delta S</math> (J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>Lorazepam</b>	-19,8	-19,8	-19,6	-23,6	-12,8
<b>Oxazepam</b>	-28,1	-29,6	-31,9	37,5	226,1
<b>Bromazepam</b>	-27,9	-20,8	-20,6	-27,9	-23,8

**Tabla 6.** Parámetros termodinámicos correspondientes a los sistemas benzodiazepina-SAB.

Los signos negativos en los valores de  $\Delta G$  encontrados revelan que los procesos de unión ocurren de manera espontánea para las tres benzodiazepinas. La formación de los compuestos de coordinación lorazepam-SAB y bromazepam-SAB ocurren mediante reacciones espontáneas y exotérmicas, acompañadas con valores negativos de  $\Delta S$ . Los valores negativos de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  indican que tanto los enlaces de hidrógeno como las fuerzas de van der Waals juegan un rol importante en el proceso de unión a SAB [143].

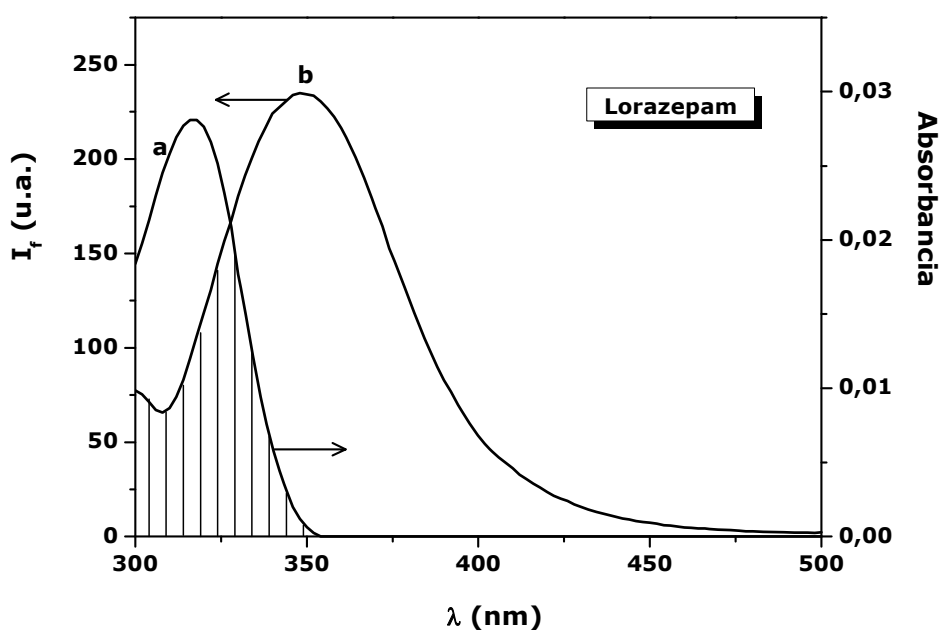
Con respecto a la formación del complejo oxazepam-SAB, el hecho de que  $\Delta H$  y  $\Delta S$  sean ambas positivas sugiere una fuerte contribución del efecto hidrofóbico.

### C.3. Cálculo de la distancia de unión

Los estudios espectrales demostraron que las benzodiazepinas forman complejos con seroalbúmina bovina. Para obtener más información acerca de los sistemas benzodiazepinas-SAB, la atención debe enfocarse a los aspectos referidos a la transferencia de energía en el sistema.

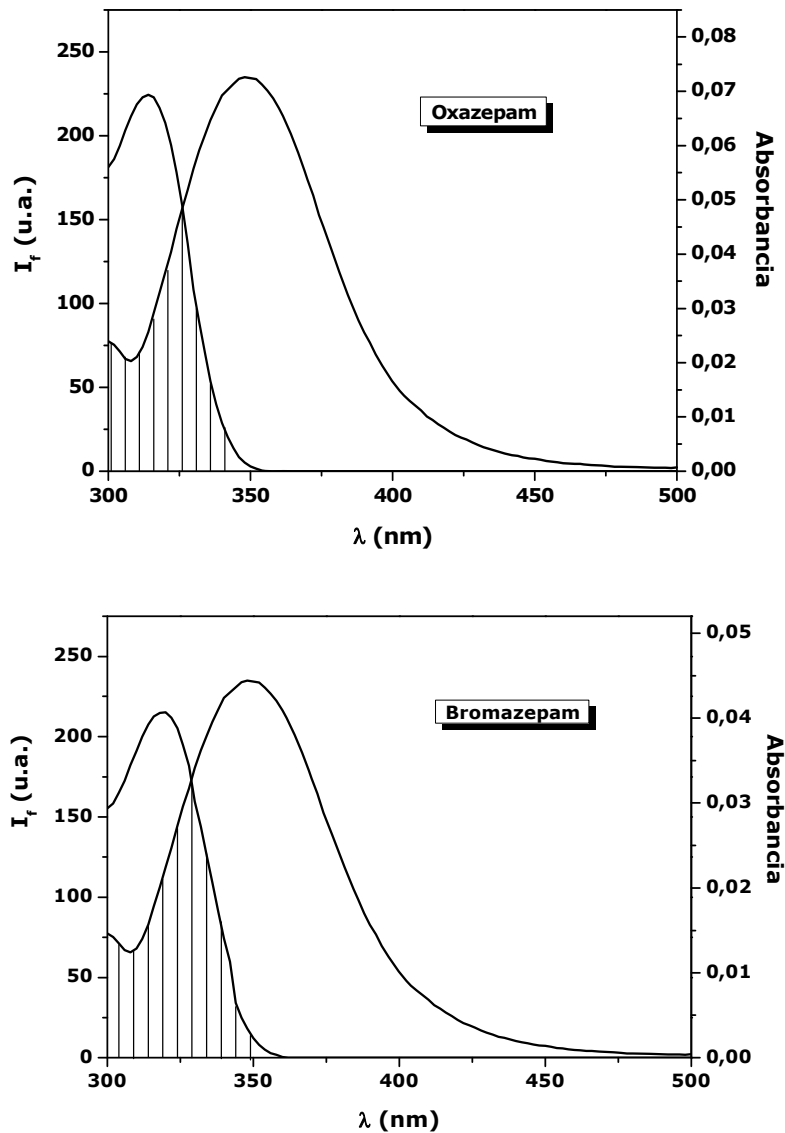
La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (RET) ocurre cuando el espectro de emisión de fluorescencia del fluoróforo se superpone con el espectro de absorción de otra molécula.

En las figuras 16a y 16b se exhiben las superposiciones espectrales producidas entre los espectros de absorción de las benzodiazepinas (que actúan como aceptores) y el espectro de emisión de la seroalbúmina bovina (actuando como donador), en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 300-500 nm.



**Figura 16a.** Superposición del espectro de fluorescencia de SAB ( $2,0 \times 10^{-5}$  M) con el espectro de absorción lorazepam ( $2,0 \times 10^{-5}$  M).





**Figura 16b.** Superposición del espectro de fluorescencia de SAB ( $2,0 \times 10^{-5}$  M) con los espectros de absorción de oxazepam y bromazepam ( $2,0 \times 10^{-5}$  M).

La importancia de la transferencia de energía por resonancia en bioquímica radica en que puede emplearse la eficiencia de transferencia de energía para evaluar la distancia entre los ligandos y los residuos de triptofano responsables de la fluorescencia intrínseca de las proteínas.

De acuerdo a la teoría de transferencia no radiativa de Förster [144], la velocidad de transferencia de energía depende de:

- (i) La orientación relativa de los dipolos del aceptor y donador;

- (ii) La extensión de la superposición entre los espectros de emisión del donador y absorción del aceptor;
- (iii) La distancia entre el donador y el aceptor.

El efecto de transferencia de energía está relacionado no sólo con la distancia entre aceptor y donador, sino también con la distancia crítica de transferencia de energía,  $R_0$ . La eficiencia de transferencia de energía,  $E$ , se describe en la siguiente ecuación:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (12)$$

donde  $F$  y  $F_0$  representan las intensidades de fluorescencia de SAB en presencia y ausencia de la benzodiazepina a una relación de concentraciones 1:1.  $E$  también puede expresarse como:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (13)$$

$r$  es la distancia entre aceptor y donador y  $R_0$  es la distancia crítica a la cual la eficiencia de transferencia de energía es del 50%.

$R_0^6$  se calcula usando la ecuación:

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} \kappa^2 N^{-4} \Phi J \quad (14)$$

donde,  $\kappa^2$  es el factor de orientación dipolar. El factor de orientación del dipolo,  $\kappa^2$ , es el parámetro más incierto en el cálculo de la distancia crítica de transferencia. Teóricamente  $\kappa^2$  puede variar en el rango de 0 a 4, los valores extremos requieren orientaciones muy rígidas. Si tanto el donador como el aceptor rotan y se considera una orientación libre,  $\kappa^2$  es igual a 2/3. Si sólo el donador es libre de rotar,  $\kappa^2$  puede variar de 1/3 a 4/3 [136].  $N$  es el índice de refracción del medio,  $\Phi$  es la eficiencia cuántica de fluorescencia del donador en ausencia del aceptor y  $J$  es la integral de solapamiento entre el espectro de emisión de fluorescencia del donador y el espectro de absorción del aceptor.

$J$  se calcula a partir de:

$$J = \frac{\sum F(\lambda)\epsilon(\lambda)\lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda)\Delta\lambda} \quad (15)$$

donde  $F(\lambda)$  es la intensidad de fluorescencia del donador a la longitud de onda  $\lambda$  y es adimensional,  $\epsilon(\lambda)$  es el coeficiente de absorción molar del aceptor a la longitud de onda  $\lambda$ .

$J$  fue evaluada integrando los espectros mostrados en las figuras 15 y 16; utilizando los valores reportados para SAB:  $\kappa^2=2/3$ ,  $\Phi=0,15$  y  $N=1,36$  [145].

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Sistema	J (cm <sup>3</sup> L mol <sup>-1</sup> )	R <sub>0</sub> (nm)	r <sub>0</sub> (nm)
Lorazepam-SAB	3,57 x 10 <sup>-16</sup>	4,57	5,54
Oxazepam-SAB	7,55 x 10 <sup>-16</sup>	5,18	6,34
Bromazepam-SAB	6,12 x 10 <sup>-16</sup>	5,08	6,87

**Tabla 7.** Parámetros de transferencia de energía para los sistemas benzodiazepina-SAB.

Todos los valores de  $r_0$  encontrados son menores que el valor académico (8 nm) [146], lo cual indica que el quenching de fluorescencia de SAB ocurre a través de un proceso no radiativo de transferencia dipolar de energía.

Asimismo, los valores de  $r_0$  obtenidos de esta forma concuerdan con los valores de literatura de unión de sustrato a SAB al sitio IIA [147].

## **D. INVESTIGACIÓN CONFORMACIONAL**

Los espectros de fluorescencia sincrónica son frecuentemente utilizados para caracterizar la interacción entre moléculas y proteínas, dado que proveen información acerca del microentorno molecular en las cercanías de las moléculas cromóforas.

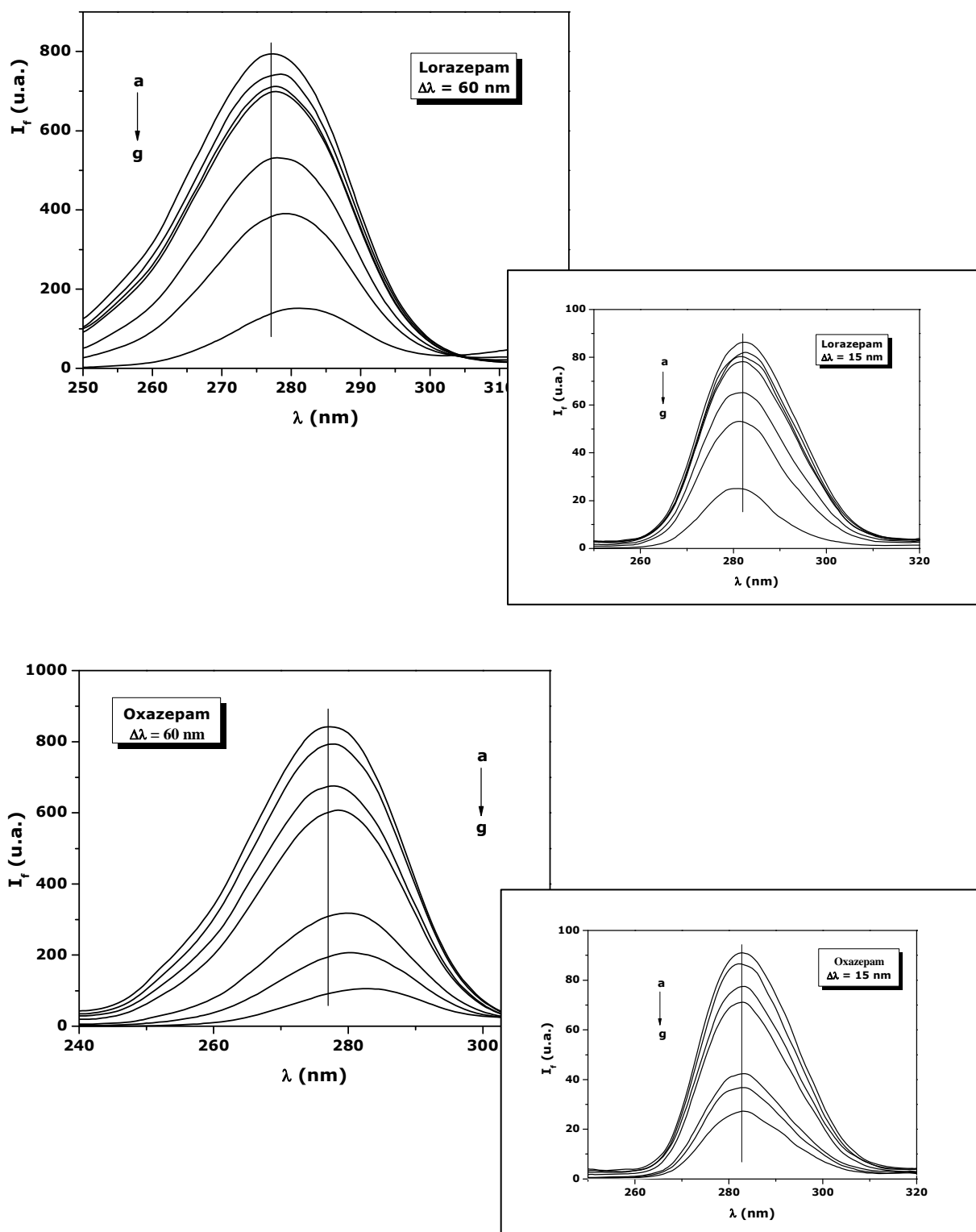
Los espectros se obtienen a través de barridos simultáneos de los monocromadores de excitación y emisión de un espectrofluorímetro, con una diferencia fija de longitudes de onda entre ellos ( $\Delta\lambda$ ) [148-150].

Los espectros de fluorescencia sincrónica de SAB reflejan las diferencias en la naturaleza de sus cromóforos: cuando la diferencia entre longitud de onda de excitación y emisión ( $\Delta\lambda$ ) se fija en 60 nm, los espectros de fluorescencia sincrónica presentan información característica de los residuos de triptofano presentes en la SAB; y cuando el valor de  $\Delta\lambda$  es de 15 nm, los espectros de fluorescencia sincrónica son característicos de los residuos de tirosina [151].

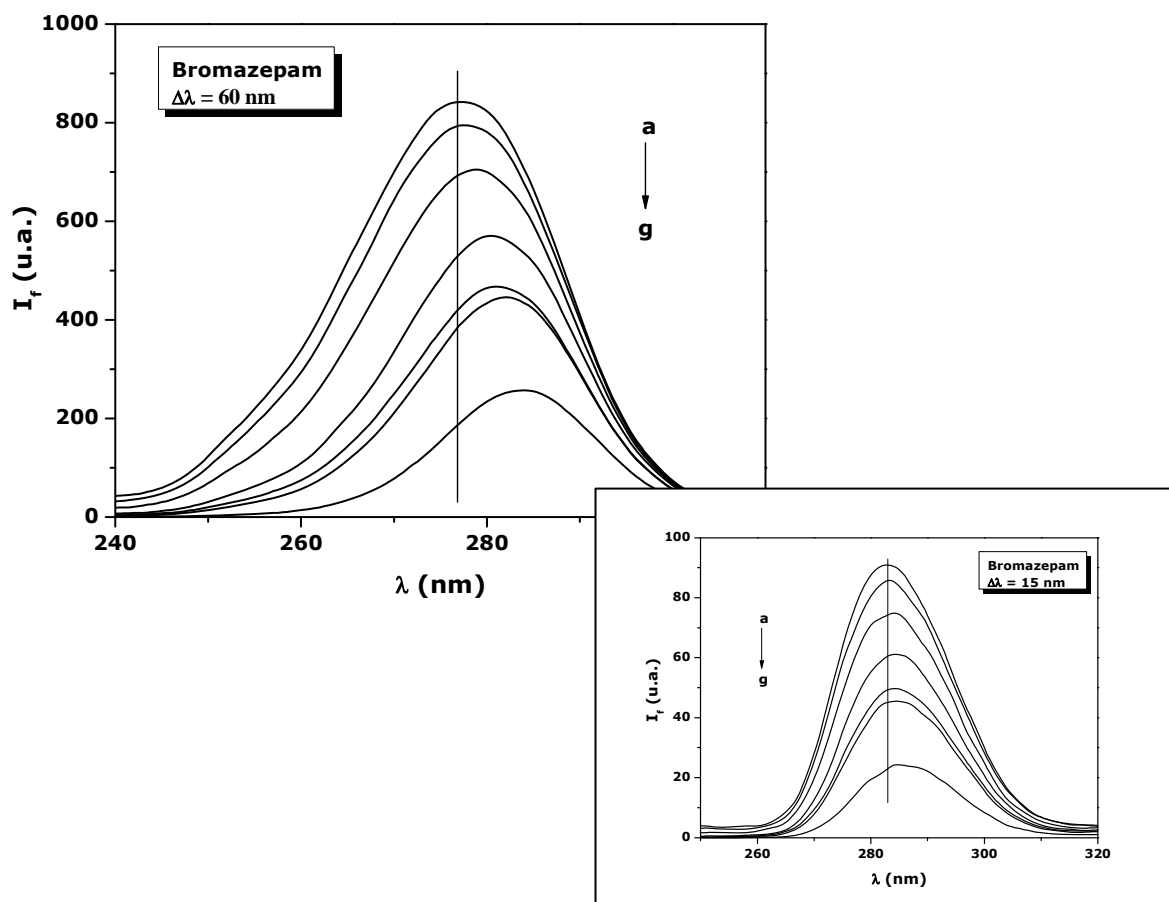
Los espectros de fluorescencia sincrónica de SAB a varias concentraciones de benzodiazepinas se registraron con  $\Delta\lambda=15$  nm y  $\Delta\lambda=60$  nm y se presentan en la figura 17.

Cuando  $\Delta\lambda= 60$  nm, la adición de las benzodiazepinas conduce a un importante descenso en la intensidad de la fluorescencia sincrónica, provocando también un desplazamiento del pico espectral. Dicho desplazamiento, hacia la zona del rojo, sugiere que aumenta la polaridad en el microentorno de los residuos de triptofano y, entonces, la hidrofobicidad decrece con las drogas.

Cuando  $\Delta\lambda= 15$  nm, los picos de emisión no muestran un desplazamiento significativo en el rango de concentración estudiado; esto indica que las benzodiazepinas generan un efecto casi nulo sobre el microentorno de los residuos de tirosina.



**Figura 17a.** Espectros de fluorescencia sincrónica de la interacción entre SAB y lorazepam y oxazepam;  $[SAB] = 1,0 \times 10^{-5}$  M;  $[BDZ] \times 10^5$  M: a-g: 0; 0,6; 0,9; 2,0; 6,0; 8,0; 10,0, respectivamente.



**Figura 17b.** Espectros de fluorescencia sincrónica de la interacción entre SAB y bromazepam; [SAB] =  $1,0 \times 10^{-5}$  M; [BDZ]  $\times 10^5$  M): a-g: 0; 0,6; 0,9; 2,0; 6,0; 8,0; 10,0, respectivamente.



## **CAPÍTULO 2**

**“Síntesis de polímeros impresos para su aplicación en la  
detección de oxazepam”**



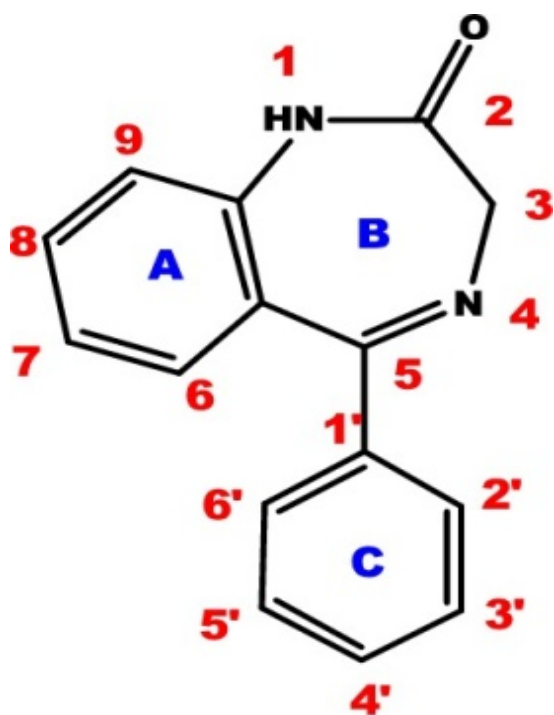


## A. EXPERIENCIAS PRELIMINARES

### A.1. Caracterización espectroscópica del oxazepam

#### A.1.a. Espectros de absorción

En términos generales, los espectros de las 1,4-benzodiazepinas pueden evaluarse como si se tratasen de espectros superpuestos de dos anillos de benceno sustituidos dentro de la molécula completa.



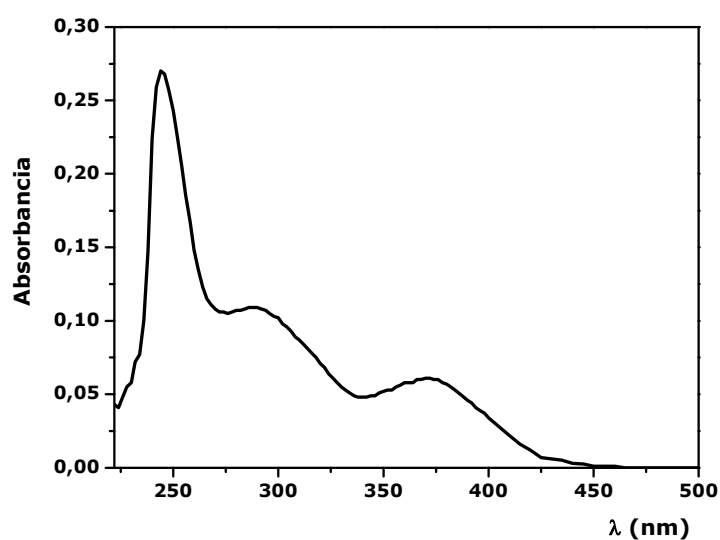
Uno de los anillos de benceno se encuentra mono-sustituído (anillo C, en posición 5 del sistema diazepínico) y el otro benceno está tri-sustituído (anillo A, conectando las posiciones 1 y 5 del sistema). De manera aproximada, el espectro del benceno mono-sustituído puede tratarse como el espectro del benceno con desplazamientos hacia mayores longitudes de onda de las bandas de 203 y 254 nm. El espectro del benceno poli-sustituído resulta de la adición de varios

corrimientos causados por los sustituyentes individuales [152].

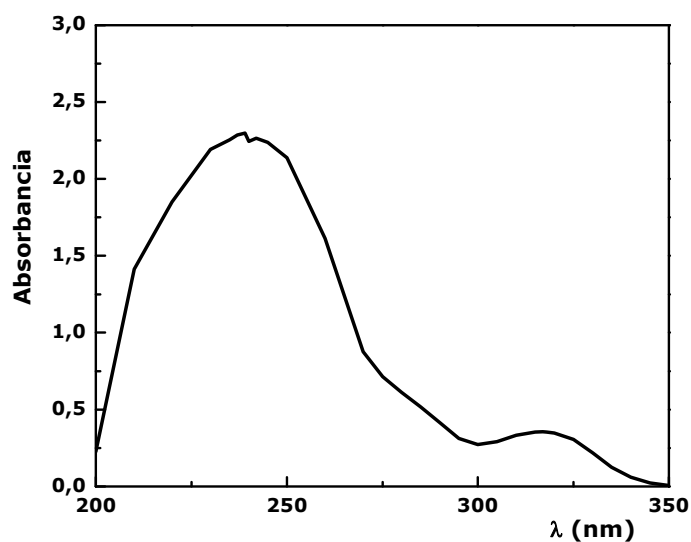
NOTA: Debido a la dificultad para adquirir benzodiazepinas comercialmente, la síntesis de polímeros impresos fue llevada a cabo, a modo de ejemplo, únicamente con la benzodiazepina oxazepam y su producto de hidrólisis. El remanente de lorazepam y bromazepam utilizados en el estudio previo (capítulo 1) no fue suficiente ya que contábamos con unos pocos miligramos (donados por una empresa farmacéutica) y el estudio previo a la síntesis de MIPs requiere una cantidad de analito considerable.

Con la finalidad de registrar los espectros de absorción de oxazepam (OXA), se prepararon disoluciones del mismo en etanol y cloroformo.

El espectro de absorción de OXA  $1,25 \times 10^{-5}$  M en cloroformo presenta máximos a aproximadamente 244, 290 y 370 nm. El espectro de absorción de OXA  $3,20 \times 10^{-4}$  M en etanol presenta máximos a aproximadamente 240 y 322 nm (figura 18).



**(a)**



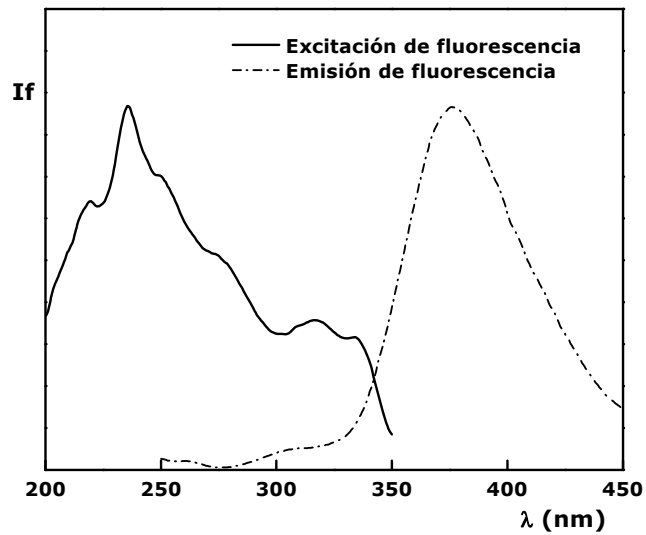
**(b)**

**Figura 18.** Espectros de absorción de OXA en: (a) cloroformo y (b) etanol.

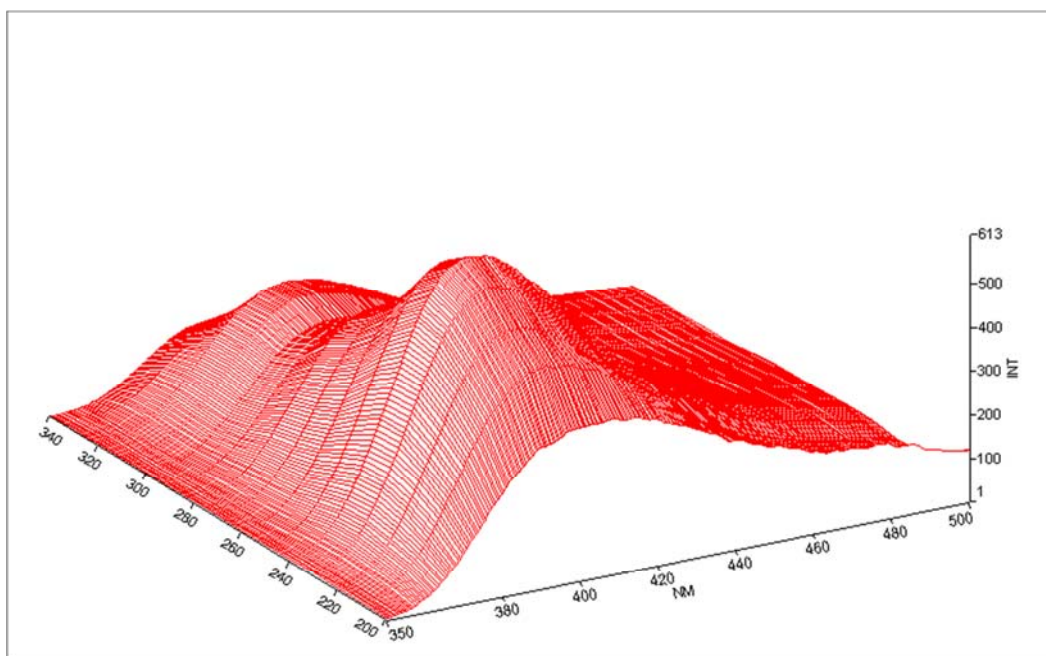
### **A.1.b. Espectros de fluorescencia**

La figura 19 muestra los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de una solución de OXA  $3,45 \times 10^{-5}$  M en etanol. Las medidas

fueron realizadas utilizando celdas de cuarzo de 10 mm de camino óptico, empleando anchos de banda de 10 nm para los monocromadores de excitación y emisión.



**Figura 19.** Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de OXA.



**Figura 20.** Espectro de fluorescencia de OXA en 3D.

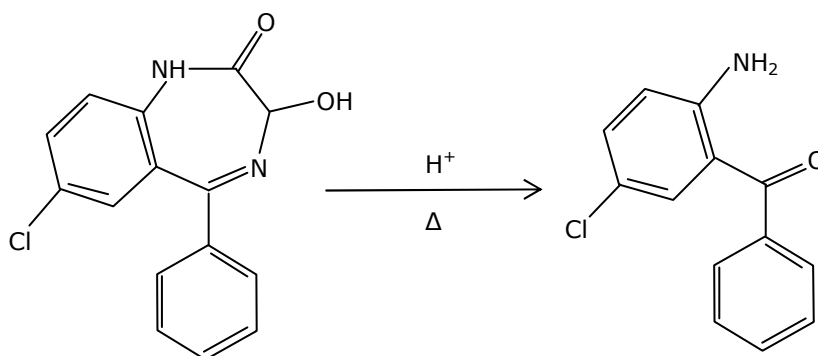
En el espectro de fluorescencia 3D de OXA se observan claramente dos máximos de excitación (a 245 y 310 nm aproximadamente) y un único máximo de emisión (a 400 nm aproximadamente).

## A.2. Estudio de la hidrólisis del oxazepam

Las benzodiazepinas son sustancias relativamente inestables, se hidrolizan en medio ácido dando lugar a la formación de sus respectivas 2-aminobenzofenonas a través de la ruptura del enlace N1-C2 del anillo diazepínico [153].

En el caso de OXA, el producto de dicha reacción es la 2-amino-5-clorobenzofenona (BZF) y, de acuerdo a la literatura [154-156], ésta presenta una eficiencia de fluorescencia mucho mayor que la del OXA.

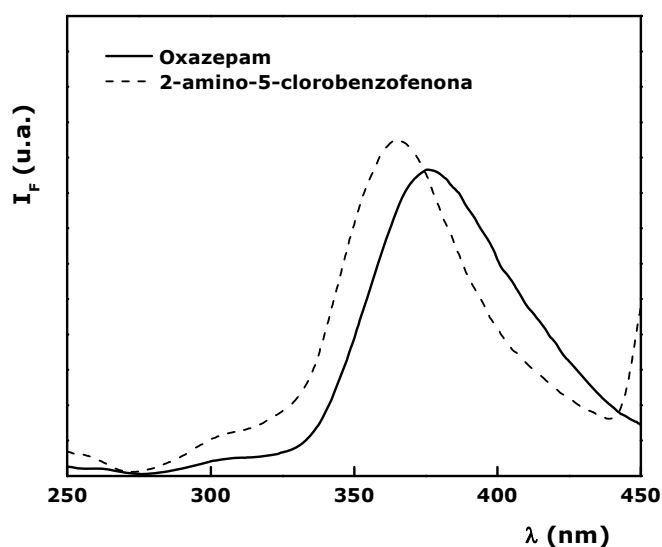
La reacción de hidrólisis es la siguiente:



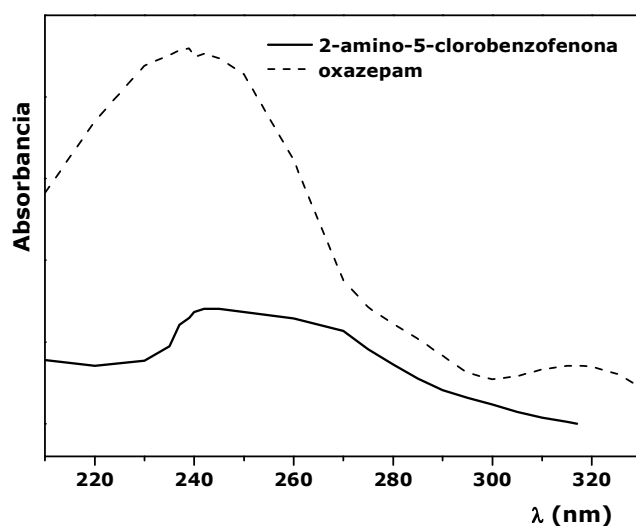
**Figura 21.** Reacción de hidrólisis del oxazepam.

### A.2.a. Método de evaluación

Para evaluar el comportamiento de la reacción de hidrólisis es necesario cuantificar ambas especies, el OXA y su producto de hidrólisis, la 2-amino-5-clorobenzofenona. Dado que tanto el espectro de absorción como el de emisión de fluorescencia de OXA se solapan con los de su respectiva benzofenona (ver figuras 22a y 22b), para evaluar los productos de hidrólisis, debió recurrirse al uso de la espectrometría de derivadas [157].



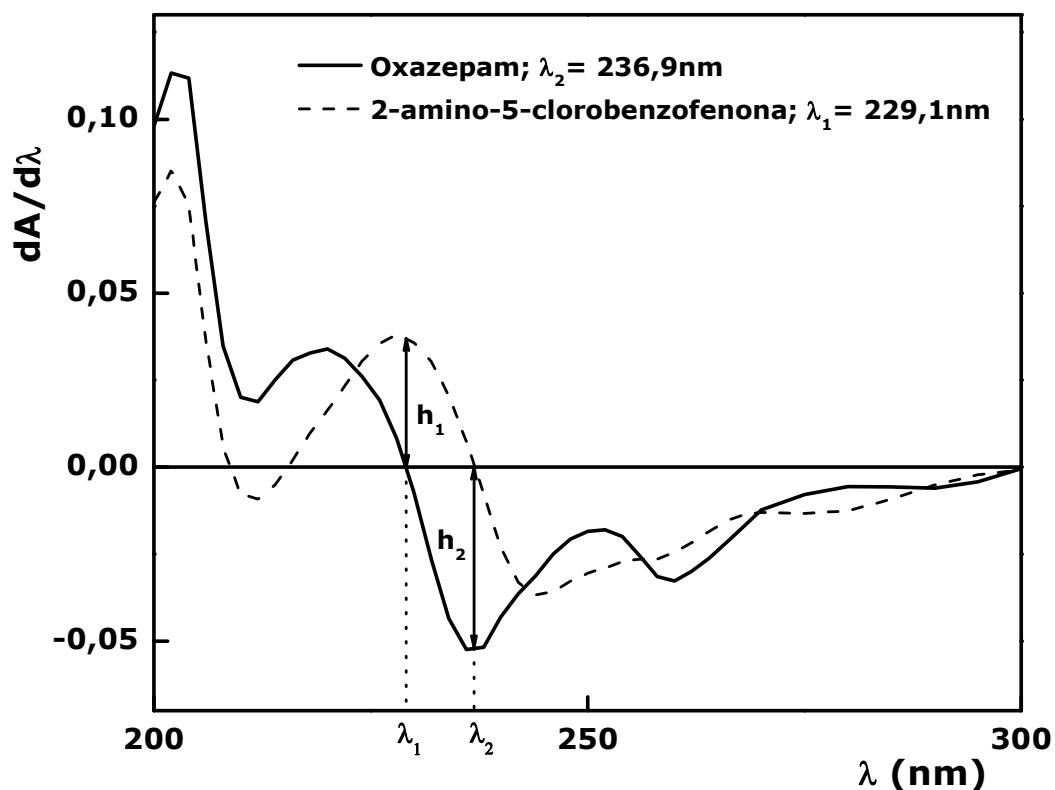
(a)



(b)

**Figuras 22a y 22b.** Superposición de los espectros de (a) emisión de fluorescencia y (b) absorción, de oxazepam y 2-amino-5-clorobenzofenona.

La espectrometría de derivadas permite, bajo ciertas condiciones, ver los diferentes componentes y hacer determinaciones cuantitativas con errores sistemáticos muy pequeños. Con tal finalidad, se realizaron las primeras derivadas de los espectros de absorción de soluciones patrones de OXA y BZF, obteniéndose la información que se muestra a continuación.

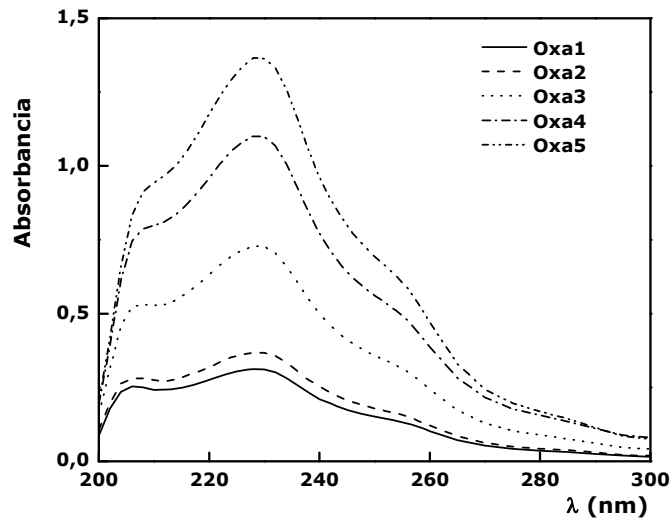


**Figura 23.** Primeras derivadas de los espectros de absorción de OXA y BZF.

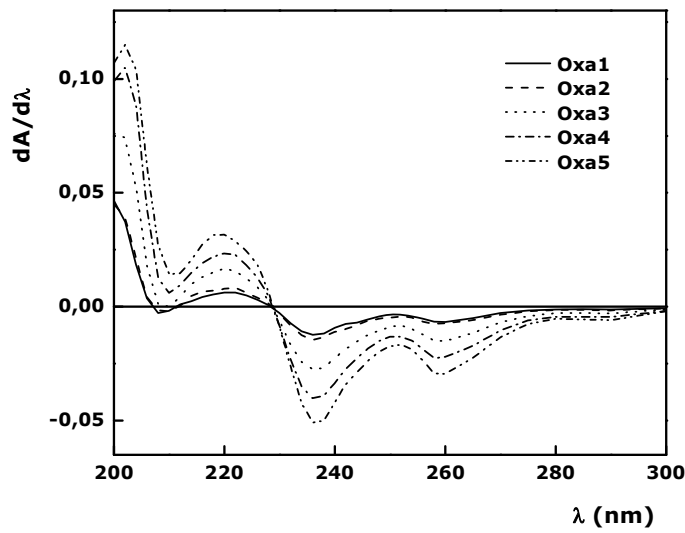
En la figura se observa que a la longitud de onda  $\lambda_1 = 229,1$  nm puede cuantificarse BZF sin que interfiera el OXA (midiendo la altura  $h_1$ ) y que a la longitud de onda  $\lambda_2 = 236,9$  nm ocurre lo contrario (midiendo la altura  $h_2$  es posible cuantificar a OXA).

De esta manera, realizando una curva de calibración de primeras derivadas para cada componente (utilizando soluciones patrones de los mismos) a la longitud de onda más conveniente, pudieron evaluarse las soluciones sometidas a los diversos tratamientos de hidrólisis.

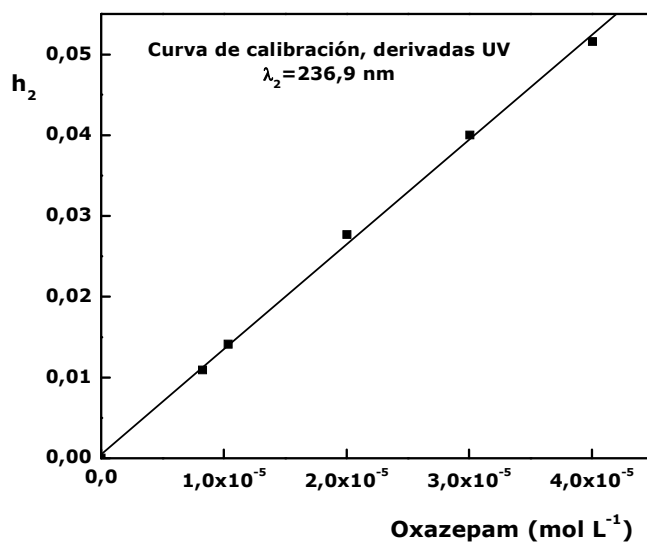
A continuación se presentan los gráficos utilizados para realizar la calibración y las rectas obtenidas para cada especie.



(a) Espectros de absorción de OXA



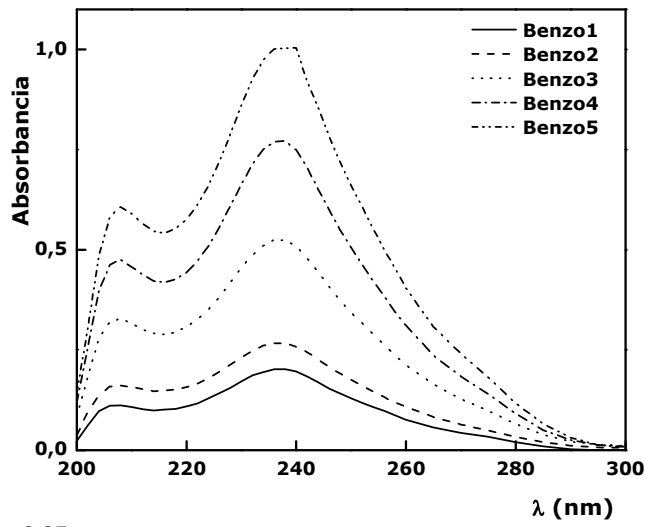
(b) Primeras derivadas de los espectros de absorción de OXA



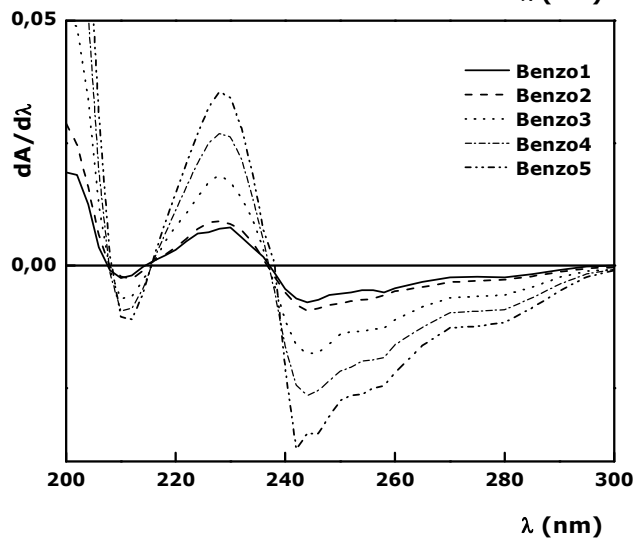
(c) Curva de calibración para OXA

Figuras 24a, 24b y 24c. Gráficos correspondientes a la calibración para OXA.

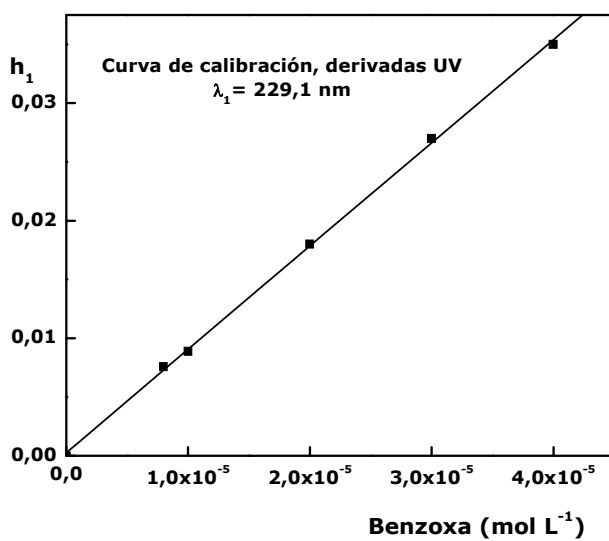




(a) Espectros de absorción de BZF



(b) Primeras derivadas de los espectros de absorción de BZF



(c) Curva de calibración para BZF

Figuras 25a, 25b y 25c. Gráficos correspondientes a la calibración para BZF.

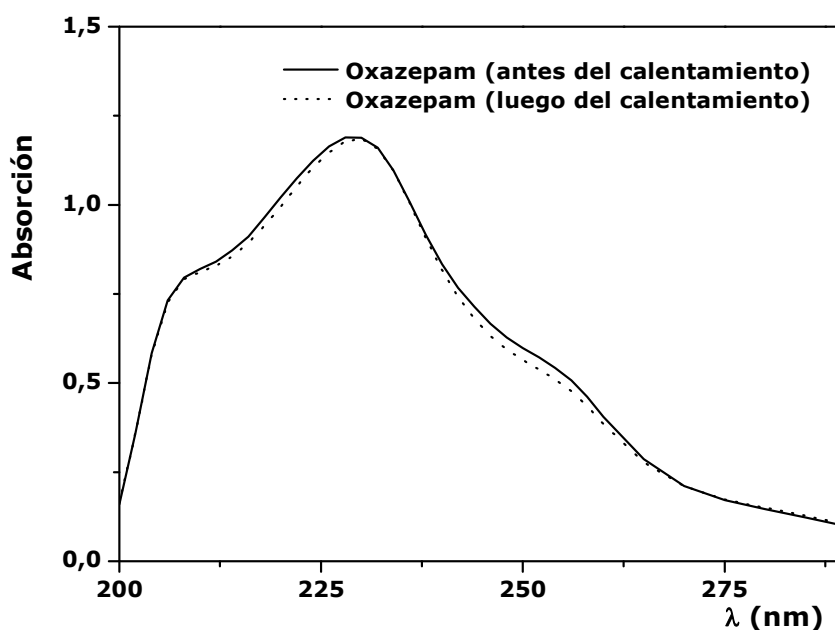
Curva	n	Ordenada $\pm s_a$	Pendiente $\pm s_b$	R
OXA	6	$5,17 \times 10^{-4} \pm 5,09 \times 10^{-4}$	$1297,91 \pm 25,53$	0,9992
BZF	6	$2,83 \times 10^{-4} \pm 2,43 \times 10^{-4}$	$877,92 \pm 10,75$	0,9997

**Tabla 8.** Resultados del análisis de regresión para las calibraciones de OXA y BZF.

### A.2.b. Condiciones de reacción

• **Efecto de la temperatura**. Se evaluó el efecto que tiene la temperatura sobre la reacción de hidrólisis del OXA. El estudio se llevó a cabo calentando durante una hora, por inmersión en baño de agua, un tubo Hach conteniendo 5 ml de una solución  $3,45 \times 10^{-5}$  M de OXA en etanol, sin agregado de ácido.

Se registraron los espectros de absorción de la solución antes y después del calentamiento, los cuales no presentaron diferencias significativas (figura 26).

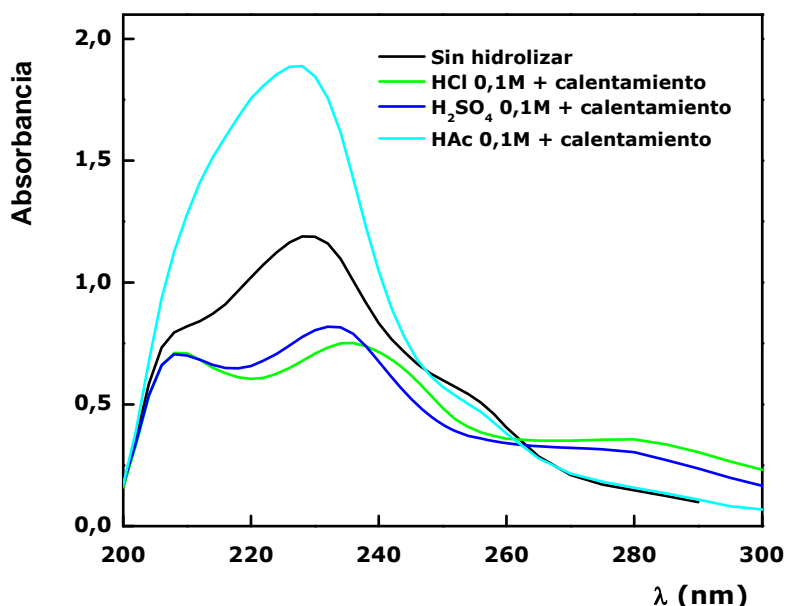


**Figura 26.** Espectros de absorción de oxazepam antes y después de ser sometido a ebullición.

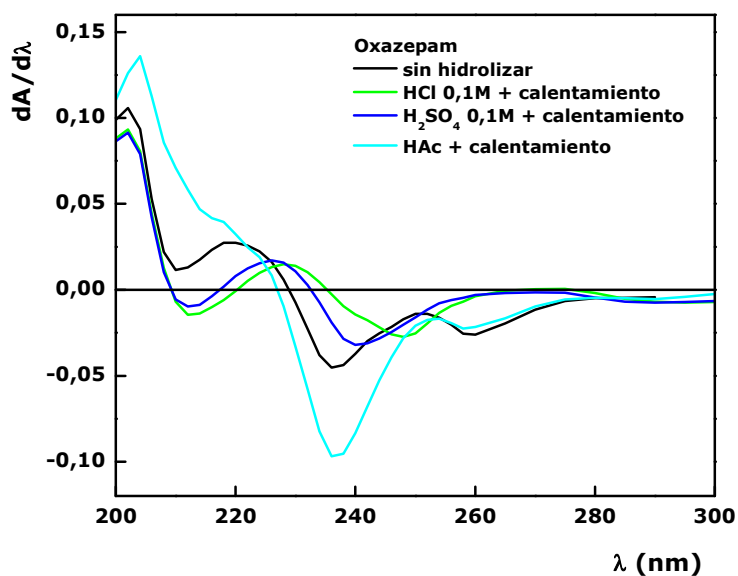
Se concluye que la hidrólisis del oxazepam no ocurre sólo por aumento de temperatura sino que además requiere un medio ácido de reacción.

• **Elección del ácido a utilizar.** Se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis de OXA en presencia de tres ácidos: ácido sulfúrico, ácido acético y ácido clorhídrico.

Se prepararon soluciones de OXA  $3,50 \times 10^{-5}$  M en HCl 0,1M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M y CH<sub>3</sub>COOH 0,1M. Se trasvasaron 10 ml de cada una de las soluciones a tubos de vidrio con tapa y los mismos fueron calentados por inmersión en baño de agua a 100°C durante 1 hora. A las soluciones resultantes se les registraron los espectros de absorción (ver figuras 27a y 27b) y se obtuvieron sus respectivas derivadas. Midiendo las alturas  $h_1$  y  $h_2$  y utilizando las curvas de calibración de primeras derivadas para OXA y BZF pudieron cuantificarse ambas especies y, de esa manera, determinar el porcentaje de hidrólisis logrado con el calentamiento en medio ácido.



**Figura 27a.** Espectros de absorción de soluciones de OXA sometidas a hidrólisis en presencia de distintos ácidos en concentraciones 0,1M.



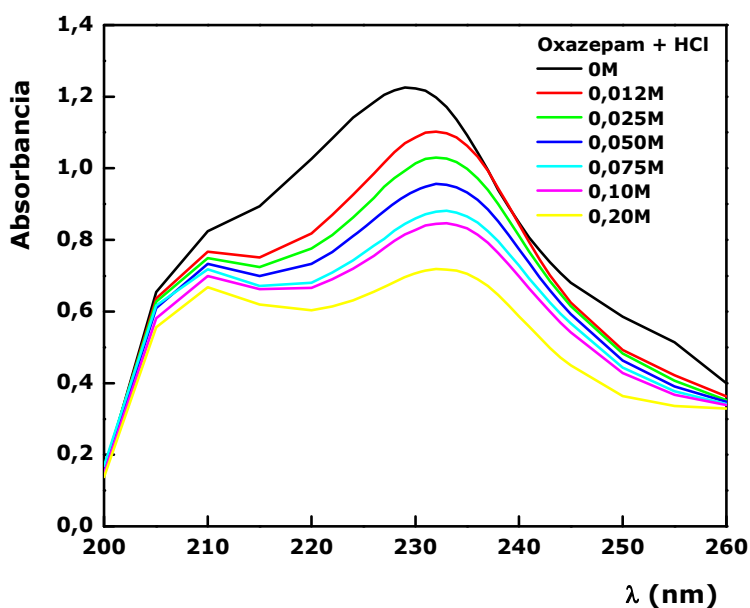
**Figura 27b.** Derivadas primeras de los espectros de absorción de OXA.

Del análisis de los resultados se extrajeron dos conclusiones:

- La reacción de hidrólisis ocurre con mayor eficiencia en presencia de ácido clorhídrico,
- A la concentración de ácido estudiada, la hidrólisis de OXA no se produce de manera apreciable.

▪ **Selección de la concentración de ácido clorhídrico adecuada.** Se llevaron a cabo las experiencias de hidrólisis de OXA en presencia de distintas concentraciones de ácido clorhídrico.

En una primera prueba se prepararon soluciones de OXA  $3,02 \times 10^{-5}$  M en HCl 0,0125M, 0,025M, 0,05M, 0,075M, 0,10 y 0,20M las cuales fueron sometidas a calentamiento por inmersión en baño de agua a 100°C por el lapso de una hora. La figura 28a muestra los espectros de absorción de las soluciones resultantes.



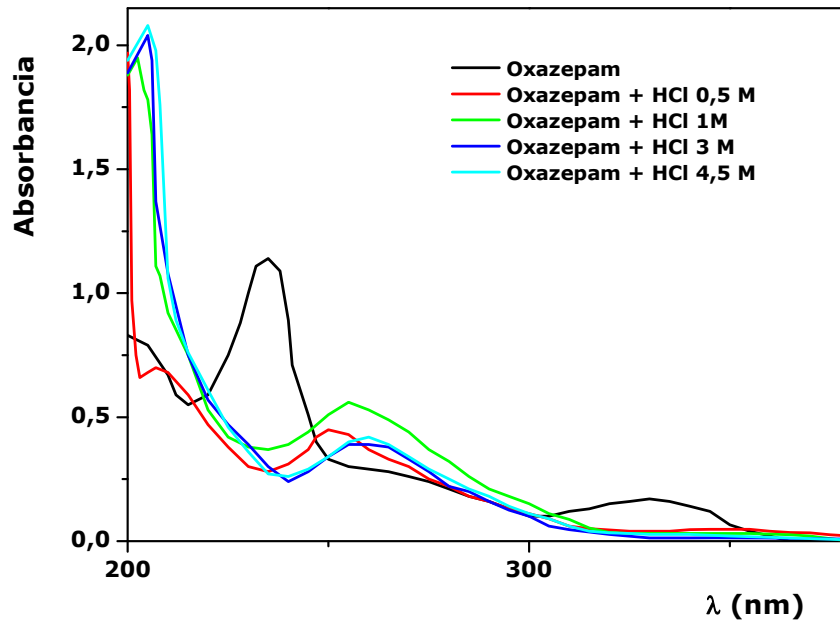
**Figura 28a.** Espectros de absorción de soluciones de OXA sometidas a hidrólisis en presencia de distintas concentraciones de ácido clorhídrico.

Las concentraciones de ácido clorhídrico evaluadas no produjeron cambios demasiado significativos sobre la solución de OXA.

Ocurre que a esa concentración de ácido, los cambios observados en los espectros de absorción ultravioleta reflejan la protonación de la molécula de OXA en medio ácido, principalmente la de los átomos de nitrógeno en posiciones 1 y 4 y posiblemente también la protonación del grupo -OH en posición 3 [158].

Se repitió el estudio de hidrólisis utilizando ácido clorhídrico pero a concentraciones más elevadas.

Se prepararon soluciones de oxazepam  $3,02 \times 10^{-5}$  M en HCl 0,5M, 1M, 3M y 4,5M y se siguió el procedimiento de análisis anteriormente descrito, concluyendo que en medio ácido clorhídrico 3M y 4,5 M la reacción de hidrólisis de OXA ocurre con mayor eficiencia. Se selecciona al ácido clorhídrico 3M para experiencias futuras.



**Figura 28b.** Espectros de absorción de soluciones de OXA sometidas a hidrólisis en presencia de distintas concentraciones de ácido clorhídrico.

Como resumen de las experiencias realizadas, la tabla siguiente refleja las condiciones de reacción seleccionadas.

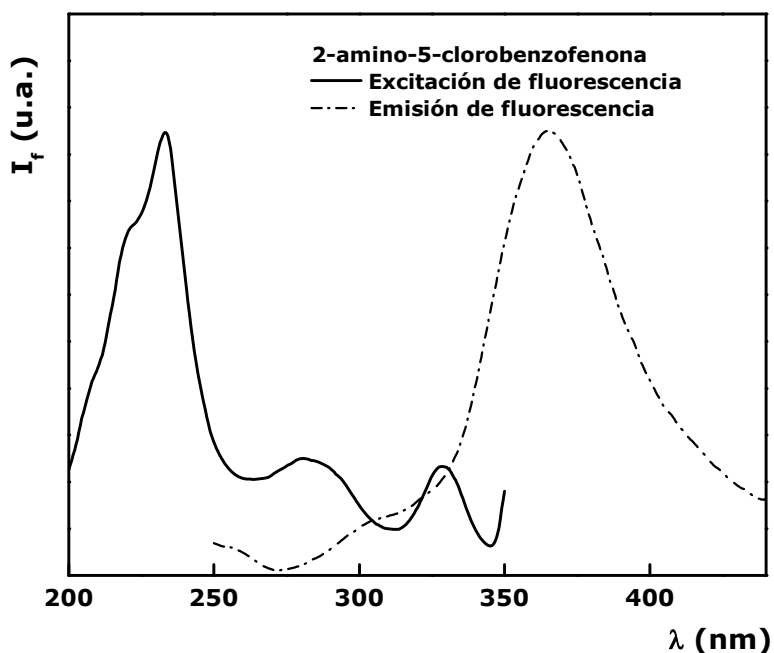
- Medio: HCl 3M
- Temperatura = 100 °C
- Tiempo: 1 hora

**Tabla 9.** Condiciones óptimas de hidrólisis para OXA.

### A.3. Caracterización espectroscópica de la 2-amino, 5-clorobenzofenona

#### A.3.a. Espectros de fluorescencia

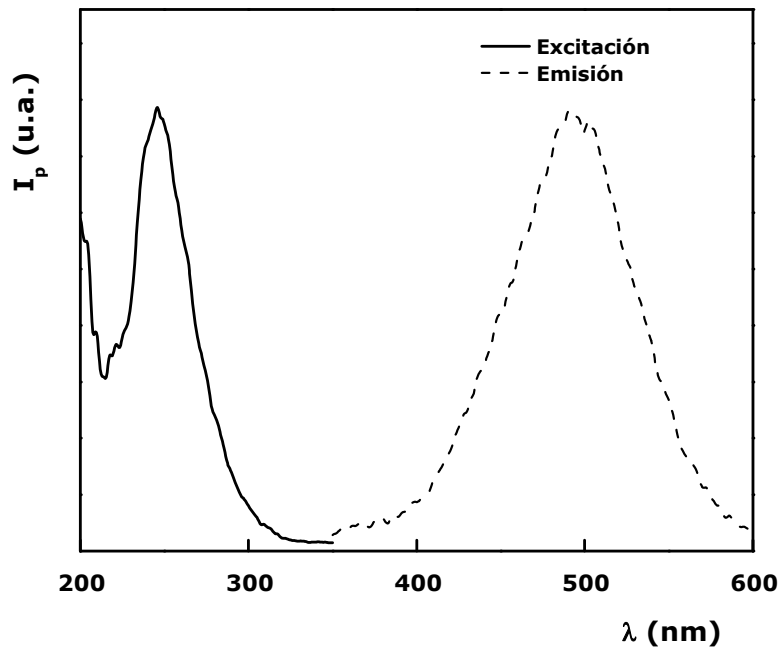
La figura siguiente muestra los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de una solución acuosa de 2-amino, 5-clorobenzofenona  $5,29 \times 10^{-5}$  M, realizados empleando anchos de banda de excitación y emisión de 10 nm. Se observa un máximo de excitación a 233 nm y un máximo en la emisión a 365 nm.



**Figura 29.** Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de una solución acuosa de BZF.

#### A.3.b. Espectros de fosforescencia

Para evaluar la presencia de emisión fosforescente se registraron los espectros de excitación y emisión de una solución  $1,72 \times 10^{-5}$  M de BZF, previamente desoxigenada mediante burbujeo con nitrógeno y utilizando yoduro de potasio como inductor de la fosforescencia. Se emplearon anchos de banda de excitación y emisión de 5 nm y 10 nm respectivamente. Se obtuvieron espectros con un máximo de excitación a 246 nm y un máximo en la emisión a 491 nm.



**Figura 30.** Espectros de excitación y emisión de fosforescencia de BZF.



## **B. PREPARACIÓN DEL POLÍMERO IMPRESO**

### **B.1. Análisis espectroscópico de prepolimerización**

Resulta obviamente importante que los monómeros funcionales interactúen fuertemente con la molécula molde y que formen con la misma complejos estables en un paso previo a la polimerización, ya que se supone que la fuerza y estructura de las uniones en solución definen la posterior afinidad y selectividad del polímero impreso. Por consiguiente, es crucial encontrar un monómero funcional adecuado, que complemente a la molécula molde y que maximice y estabilice la formación del complejo.

El monómero más ampliamente utilizado en el desarrollo de polímeros molecularmente impresos es el ácido metacrílico (MAA). Se presume que éste actúa mediante interacciones iónicas con las aminas y a través de enlaces de hidrógeno con las amidas, carbamatos y grupos hidroxilo. Dado que la 2-amino, 5-clorobenzofenona posee en su estructura un grupo amino, se utilizó al ácido metacrílico como monómero funcional. Asimismo se tuvo en cuenta la utilización de un co-monómero, estireno, con la finalidad de promover las interacciones  $\pi$ - $\pi$  con los grupos fenilos de la BZF [159].

Puede obtenerse un diseño para la síntesis del MIP empleando un método espectroscópico, una herramienta rápida para evaluar las interacciones entre el monómero funcional y la molécula molde en solución, realizando una imitación de la pre-polimerización [160].

En nuestro caso, las fuerzas de interacción MAA-BZF y estireno-BZF-MAA se determinaron utilizando los métodos de fluorescencia y UV-vis.

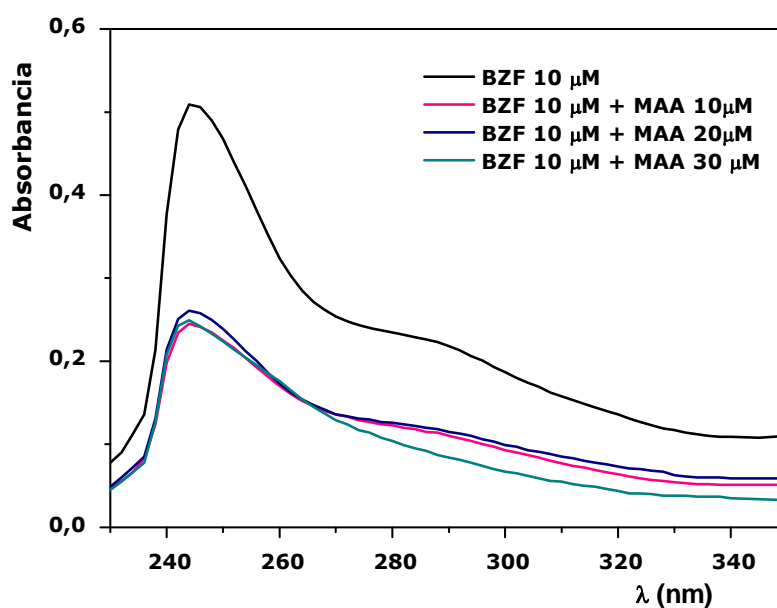
Para ello se registraron los cambios en los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de BZF a causa de una titulación espectroscópica por adición de:

- Solución de MAA (0, 10, 20 y 30  $\mu$ M) sobre una solución de BZF de concentración constante (10  $\mu$ M), en cloroformo.
- Solución de estireno (0, 10, 20 y 30  $\mu$ M) sobre una solución de BZF de concentración constante (10  $\mu$ M), en cloroformo.

- Solución de estireno/MAA (0/0, 10/10, 25/25  $\mu\text{M}$ ) sobre una solución de BZF de concentración constante (10  $\mu\text{M}$ ), en cloroformo.
- Solución de estireno (0, 10, 20 y 30  $\mu\text{M}$ ) sobre una solución de BZF de concentración constante (10  $\mu\text{M}$ ), en acetonitrilo.

Las titulaciones con solución de estireno (en cloroformo y en acetonitrilo) no generaron cambios apreciables sobre los espectros de la solución de BZF.

Con la adición de soluciones de MAA el espectro de emisión de BZF muestra un pequeño desplazamiento hacia la zona del azul, acompañado de una gradual disminución en la intensidad. El espectro de absorción UV también presenta cambios (figura 31); la primera banda de absorción de BZF disminuye con el aumento de la concentración de MAA.



**Figura 31.** Cambios en el espectro de absorción de BZF por efecto de la adición de MAA.

Del análisis de los resultados, puede deducirse que las moléculas de BZF interactúan en solución de manera más efectiva con el MAA que con el estireno a las mismas concentraciones. Asimismo se evidencia la presencia de interacción, a través de enlaces no covalentes, entre MAA y BZF.

## B.2. Síntesis inicial del polímero impreso (MIP)

Como una primera aproximación, utilizando datos de bibliografía [43], se sintetizó un polímero impreso con BZF con la finalidad de corroborar la respuesta del polímero a la presencia de dicha molécula.

Se mezclaron 21 mg (0,09 mmol) de BZF con 2 ml de cloroformo en un tubo de borosilicato con tapa, el cual se sometió a sonicación por 15 minutos hasta disolución completa de la BZF. Luego se adicionaron 32  $\mu$ L (0,37 mmol) de MAA y 531  $\mu$ L (2,8 mmol) de etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) como agente de entrecruzamiento, agitando la mezcla en vortex por 15 minutos más.

Por último, con el tubo sumergido en baño de hielo, se agregaron 3 mg (0,019 mmol) de  $\alpha,\alpha'$ -Azoisobutironitrilo (AIBN), seguido de 5 minutos más de sonicación.

La mezcla se desoxigenó mediante burbujeo con nitrógeno durante 10 minutos (es necesario eliminar el oxígeno porque inhibe la polimerización) y luego se sometió a calentamiento a 60°C durante 16 horas.

Al mismo tiempo que se sintetizaban estos materiales se prepararon las mismas mezclas pero sin el agregado de BZF. Esto es lo que se denomina polímero no impreso (NIP). Estos polímeros ayudarán a evaluar la selectividad de los MIP.

Después del período de reacción se obtuvieron bloques sólidos, amarillentos en el caso de los MIPs y blancos para los NIPs.

Para utilizar estos polímeros se requiere un tamaño pequeño de partículas. Para ello se trituró el material obtenido de manera manual, utilizando un mortero de ágata y tamizando la molienda obtenida para reservar la fracción de partículas de tamaño comprendido entre 70–100 mesh (210–149  $\mu$ m de diámetro).

A continuación se procedió al lavado de los polímeros, con un solvente de mayor polaridad que el utilizado en la síntesis, con la finalidad de extraer la molécula molde de la matriz polimérica. Para ello se realizó una extracción sólido-líquido con una mezcla metanol/ácido acético 90:10 (v:v) mediante soxhlet durante 24 horas. Se repitió el procedimiento de extracción pero utilizando sólo metanol como disolvente de lavado.

Finalmente, el sólido se secó en estufa a 40°C durante 24 horas.

Se evaluaron las sucesivas fracciones de lavado, registrando sus espectros UV hasta verificar la desaparición de la banda a 250 nm correspondiente a BZF.

El MIP obtenido se introdujo en una celda de flujo y sobre el mismo se hizo circular una solución de metanol/ácido acético 90:10 (v:v) utilizando un sistema de flujo sencillo. Se realizó el control de la elución mediante el seguimiento de la señal de fluorescencia del polímero empaquetado en la celda de flujo a las longitudes de onda seleccionadas. En el perfil de intensidades a lo largo del tiempo pudo observarse que cuando a través del sistema de flujo se hace circular la fase móvil se consigue una estabilización de la señal. Cuando se inyecta una solución de BZF, el polímero es capaz de reconocerlo y retenerlo por un determinado período de tiempo durante el cual se registra un pico en la señal.

Asimismo, se llevó a cabo la misma experiencia pero utilizando el polímero no impreso como relleno de la celda. En este caso se observó la línea de base cuando se hizo circular la fase móvil por el sistema pero no se observaron cambios apreciables frente a las inyecciones de solución de BZF.

Con esta experiencia se comprobó que el mecanismo de respuesta del polímero impreso ante la presencia de BZF es el esperado.

Los detalles del sistema por inyección en flujo se presentan en el capítulo 3, sección B.1.a.

### **B.3. Influencia de las condiciones de polimerización en las propiedades de retención del MIP**

Una vez comprobado que el polímero podía ser utilizado para el reconocimiento de BZF, se continuó con la optimización de la composición del polímero para seleccionar aquel que proporcionara mejores características de retención.

Debido al elevado número de variables que pueden influir en las características del polímero obtenido, la optimización del proceso de síntesis resulta compleja. Tomando como punto de partida las cantidades utilizadas en la síntesis previa y teniendo en cuenta datos bibliográficos [35, 161,162] se prepararon una serie de mini-MIP<sub>s</sub>, variando las concentraciones de los

reactivos utilizados. Todos los polímeros fueron evaluados a través de ensayos de unión.

### **B.3.a. Ensayos de unión**

Los ensayos de unión se llevaron a cabo poniendo en contacto cada MIP/NIP con soluciones estándar de BZF, preparadas en el solvente utilizado para la polimerización [163,164].

Para ello se pesaron cantidades idénticas de cada polímero y se mezclaron con una solución de concentración conocida de BZF en cloroformo. Las mezclas fueron agitadas manualmente e incubadas a temperatura ambiente por cierto tiempo.

Luego del período de incubación las muestras fueron centrifugadas y se utilizaron los sobrenadantes para medir la concentración de BZF remanente en solución. Se adicionó cierto volumen sobre un vial conteniendo cloroformo y sobre la solución resultante se analizó el contenido de BZF por cromatografía gaseosa, en las condiciones de operación que se detallan a continuación:

Columna: RT65TG

Longitud: 30 m

Diámetro interno: 0,25 mm

Espesor de film: 0,10  $\mu\text{m}$

Gas portador: nitrógeno

Flujo total: 53,5 ml/min

Flujo en la columna: 0,50 ml/min

Velocidad lineal: 19,8 cm/s

Temperatura inyector: 280 °C

Volumen de inyección: 2  $\mu\text{L}$

Modo de inyección: split

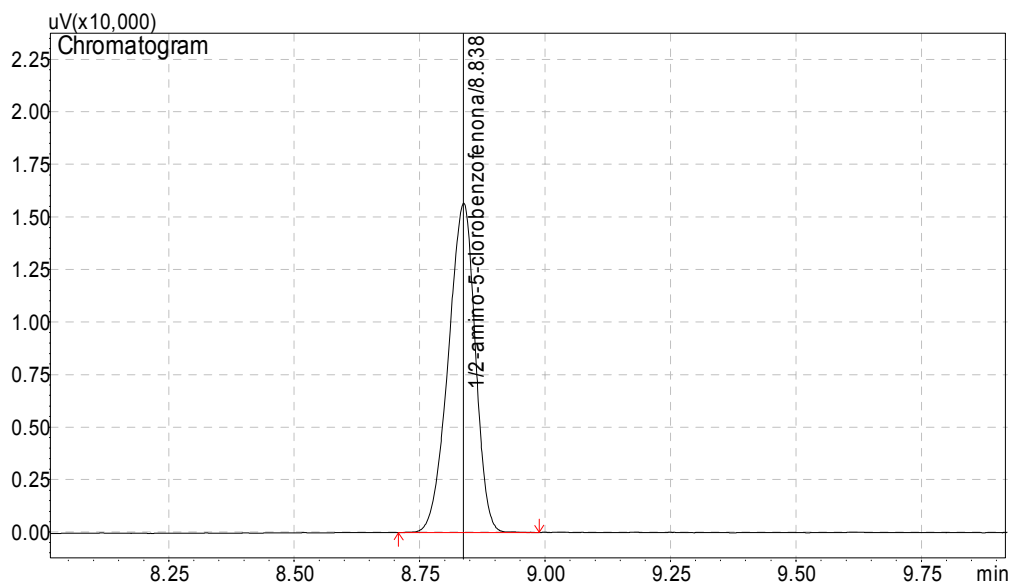
Relación de split: 100,0

Programa de temperatura: 225 °C durante 10 minutos

Detector: FID

Temperatura del detector: 300 °C

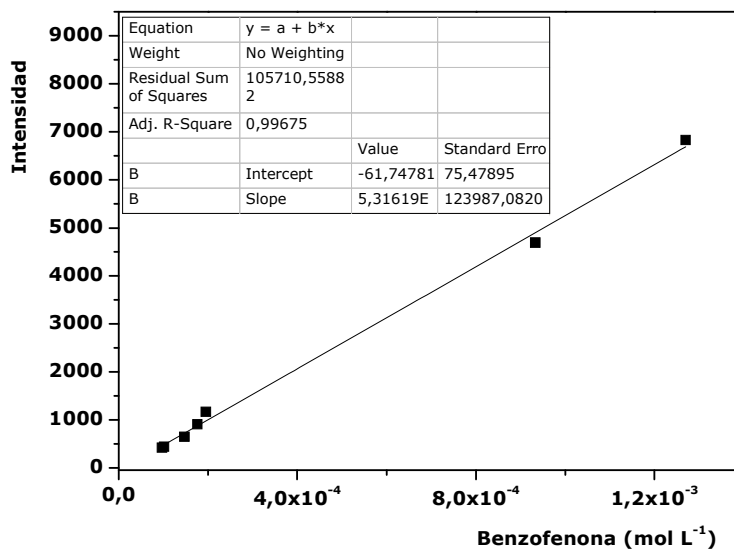
Tiempo de retención de BZF: 8,84 minutos



**Figura 32.** Cromatograma de BZF.

La cantidad de BZF unida al polímero se calculó restando la concentración de BZF remanente en solución (luego del período de incubación) a la concentración de BZF inicial.

Para cuantificar la BZF se generó una curva de calibración con soluciones estándar (figura 33).



**Figura 33.** Curva de calibración para BZF.

**B.3.b. Selección del disolvente**

En general, para estabilizar complejos basados en la formación de enlaces por puentes de hidrógeno o fuerzas electrostáticas se eligen disolventes apróticos o de baja constante dieléctrica como por ejemplo tolueno, acetonitrilo o cloroformo, ya que facilitan dichas uniones.

Teniendo en cuenta la alta solubilidad de BZF en acetonitrilo y cloroformo se utilizaron éstos disolventes para realizar los ensayos de prepolimerización (B.1.). De acuerdo a los resultados obtenidos, a partir de los cuales se seleccionó al MAA como monómero funcional a utilizar, quedó establecido el cloroformo como solvente de polimerización, ya que el acetonitrilo se había utilizado sólo para evaluar al estireno. El cloroformo presenta una elevada capacidad para estabilizar el complejo de prepolimerización BZF/MAA.

**B.3.c. Selección de la relación [monómero] / [molde]**

Para seleccionar la relación concentración de monómero (MAA) / concentración de molécula molde (BZF) que genere la mejor capacidad retentiva en el polímero impreso, se sintetizaron una serie de polímeros cuyas composiciones se indican en la tabla 10. Para ello se mantuvo la relación de concentraciones [entrecruzante] / [monómero] constante e igual a 7,5.

MIP	[MAA]/[BZF]	Cantidades (mmol)			Composición
		BZF	MAA	EGDMA	
1	2	0,043	0,086	0,647	10 mg BZF + 7 µl MAA + 122 µl EGDMA + 3 mg AIBN + 1 ml CHCl <sub>3</sub>
2	4	"	0,172	1,290	10 mg BZF + 14 µl MAA + 243 µl EGDMA + 3 mg AIBN + 1 ml CHCl <sub>3</sub>
3	6	"	0,258	1,935	10 mg BZF + 22 µl MAA + 364 µl EGDMA + 3 mg AIBN + 1 ml CHCl <sub>3</sub>
4	8	"	0,344	2,580	10 mg BZF + 29 µl MAA + 486 µl EGDMA + 3 mg AIBN + 1 ml CHCl <sub>3</sub>

**Tabla 10.** Composición de los polímeros ensayados para seleccionar la relación [monómero] / [molde].

Los polímeros fueron sintetizados, molidos, tamizados, lavados y secados de la manera descrita en B.2.

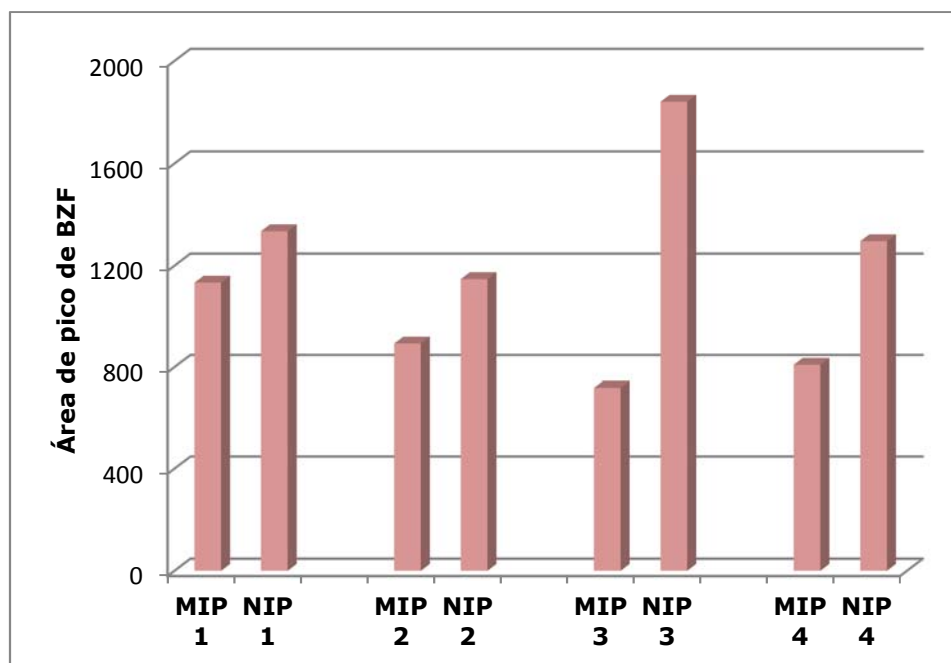


Para evaluar la capacidad de retención de los mismos se llevaron a cabo los ensayos de unión. Dado que todos los MIPs poseen composiciones distintas en general (la relación en estudio no es la única variable) no es posible sacar conclusiones comparando los polímeros impresos entre sí. Se sintetizaron los respectivos polímeros no impresos para realizar dicha comparación.

El estudio se llevó a cabo pesando 13 mg de cada uno de los MIPs/NIPs, en tubos de ensayo con tapa, sobre los cuales se adicionaron 2 ml de una solución  $2,52 \times 10^{-4}$  M de BZF en cloroformo. Los tubos fueron agitados con vortex e incubados por 48 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido el período de incubación las mezclas se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm. Se utilizaron los sobrenadantes para determinar la concentración de BZF en solución por cromatografía gaseosa. En la figura 34 se muestran los resultados obtenidos.





**Figura 34.** Áreas de pico correspondientes a BZF remanente en solución transcurrido el período de incubación con cada MIP / NIP.

En el gráfico puede observarse que, en todos los casos, el polímero impreso retiene mayor cantidad de BZF que su respectivo polímero no impreso.

Asimismo, la mayor diferencia de retención de BZF entre MIP/NIP se da para el polímero número 3; el mismo fue sintetizado con una concentración de monómero funcional (MAA) seis veces mayor a la de BZF.

Para futuras síntesis se considera la relación  $[MAA] / [BZF] = 6$  como óptima.

#### **B.3.d. Selección de la relación [entrecruzante] / [monómero]**

De la misma manera que lo descrito en B.3.c., se llevó a cabo un estudio para seleccionar la relación de concentraciones entrecruzante (EGDMA) / monómero (MAA) a utilizar. Se sintetizaron una serie de polímeros manteniendo la relación de concentraciones monómero / molde constante e igual a 6 y variando la relación de concentraciones entrecruzante / monómero, de acuerdo a lo que se indica en la tabla siguiente.

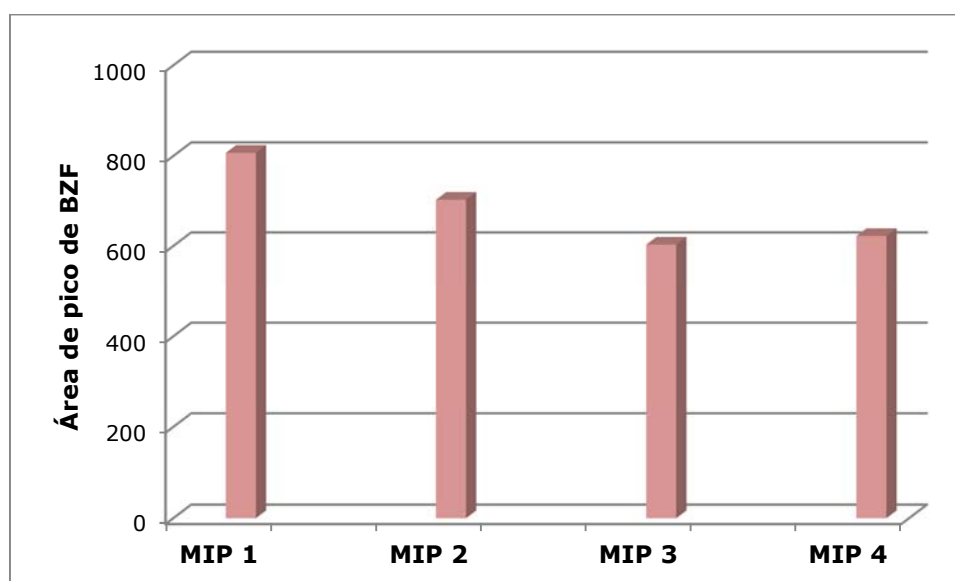
MIP	[EGDMA]/[MAA]	Cantidades (mmol)			Composición
		BZF	MAA	EGDMA	
1	2,5	0,043	0,258	0,645	10 mg BZF + 22 µl MAA + 122 µl EGDMA + 3 mg AIBN + 1 ml CHCl <sub>3</sub>
2	5	"	0,258	1,290	10 mg BZF + 22 µl MAA + 243 µl EGDMA + 3 mg AIBN + 1 ml CHCl <sub>3</sub>
3	7,5	"	0,258	1,935	10 mg BZF + 22 µl MAA + 364 µl EGDMA + 3 mg AIBN + 1 ml CHCl <sub>3</sub>
4	10	"	0,258	2,580	10 mg BZF + 22 µl MAA + 486 µl EGDMA + 3 mg AIBN + 1 ml CHCl <sub>3</sub>

**Tabla 11.** Composición de los polímeros ensayados para seleccionar la relación [entrecruzante] / [monómero].

Los polímeros fueron sintetizados, molidos, tamizados, lavados y secados de la manera descrita en B.2.

Se realizaron ensayos de unión para cada uno de los polímeros impresos de la manera descrita en B.3.b. Los polímeros fueron comparados entre sí dado que la única variante de síntesis entre ellos es la relación en estudio.

Se obtuvieron los siguientes resultados.



**Figura 35.** Áreas de pico correspondientes a BZF remanente en solución transcurrido el período de incubación con cada MIP.

Del análisis de los resultados se desprende que el MIP que posee una mayor propiedad retentiva para BZF es el número 3; el mismo fue sintetizado con una concentración de entrecruzante (EGDMA) 7,5 veces mayor a la del monómero funcional (MAA).

Para futuras síntesis se considera la relación  $[EGDMA]/[MAA]=7,5$  como óptima.

#### B.4. Preparación de los polímeros de trabajo

A partir de los resultados obtenidos en B.3. se establecieron las condiciones óptimas para la síntesis de los polímeros impresos con BZF. Las mismas se reflejan en la tabla 12.

- **Solvente porogénico: cloroformo**
- **[MAA] / [BZF] = 6**
- **[EGDMA] / [MAA] = 7,5**
- **Temperatura de polimerización: 60°C**
- **Tiempo de reacción: 18 hs**

**Tabla 12.** Condiciones óptimas para la síntesis de polímeros impresos con BZF.

##### B.4.a. Síntesis

Se prepararon los polímeros de trabajo (impreso y no impreso), respetando las condiciones seleccionadas y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (en el caso de la síntesis del polímero no impreso se omite el agregado de BZF y se continúa con el resto de los pasos):

- Se pesaron 0,19 mmol (43 mg) de BZF en un tubo de borosilicato con tapa y se adicionaron 3 ml de cloroformo. La mezcla fue sonicada por 15 minutos hasta disolución completa de la BZF.

- Se añadieron 1,185 mmol (100  $\mu$ L) de MAA agitando suavemente. Inmediatamente se adicionó el entrecruzante EGMA (8,5 mmol; 1600  $\mu$ L) y se agitó en vortex durante 15 minutos más.
- En último lugar se agregó el AIBN (0,05 mmol; 9 mg) a la mezcla, que luego se sometió a sonicación por 5 minutos.
- Inmediatamente se sumergió la mezcla en baño de hielo y se purgó durante 10 minutos con una corriente de nitrógeno para desoxigenar el sistema.
- Finalmente el tubo se sometió a calentamiento en estufa a 60°C por un período de 18 hs.
- Se obtuvieron dos bloques sólidos (MIP y NIP) que fueron molidos y tamizados hasta obtener partículas micrométricas y de tamaño uniforme comprendido entre los 149 y 210  $\mu$ m.

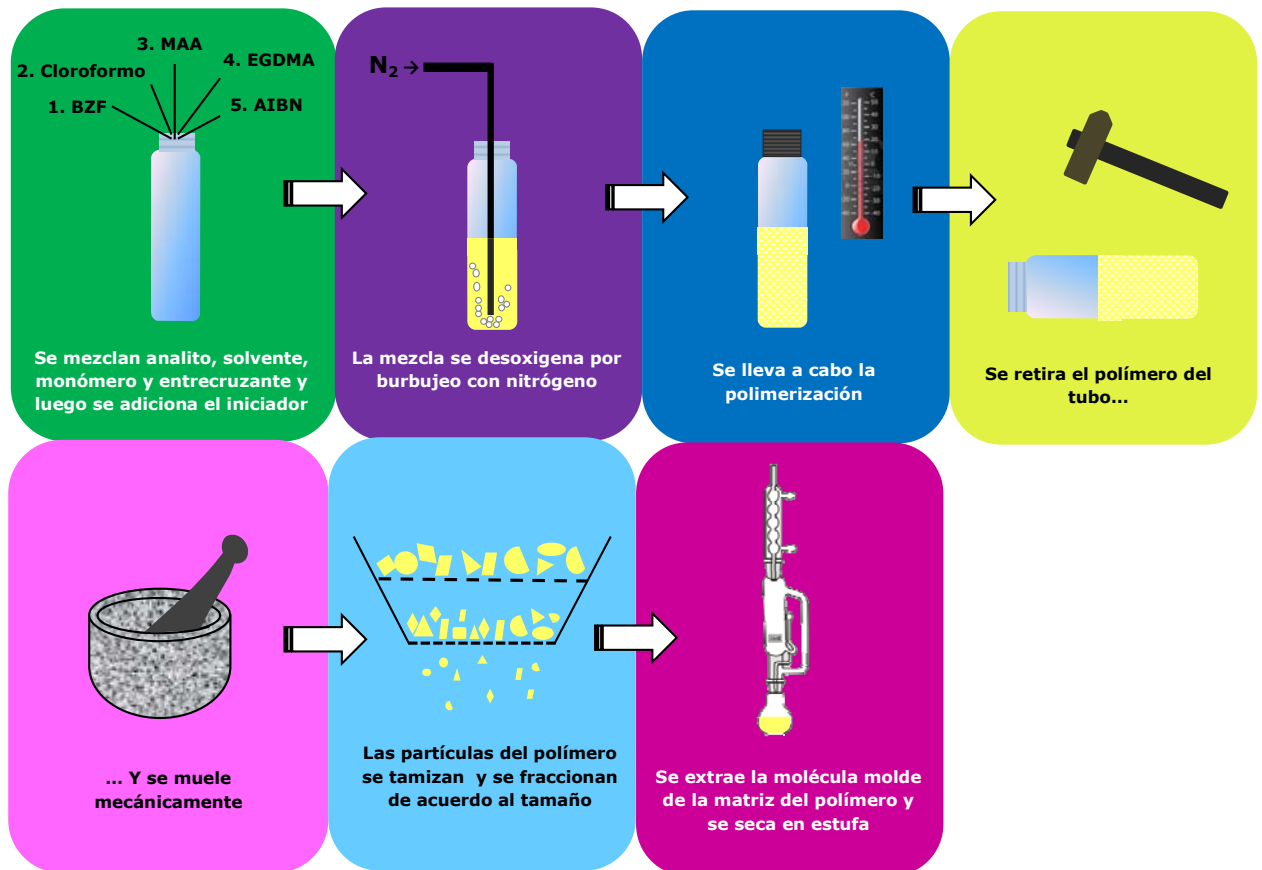
#### **B.4.b. Extracción de la molécula molde**

La extracción de BZF de la matriz polimérica se llevó a cabo mediante extracción sólido-líquido en soxhlet con una mezcla metanol-ácido acético 9:1 durante 24 hs, efectuando una nueva extracción en soxhlet con metanol puro por 24 horas más.

Finalmente el sólido particulado se secó en estufa a 40°C durante 24 horas.

Se evaluaron las sucesivas fracciones de lavado, evaluando sus espectros UV hasta verificar la desaparición de la banda a 250 nm correspondiente a BZF.

En la figura 36 se esquematiza el procedimiento completo de preparación de los polímeros impresos con BZF.



**Figura 36.** Esquema de síntesis de los MIPs.



## **CAPÍTULO 3**

**“Desarrollo de un optosensor utilizando MIPs como fase de reconocimiento selectivo”**





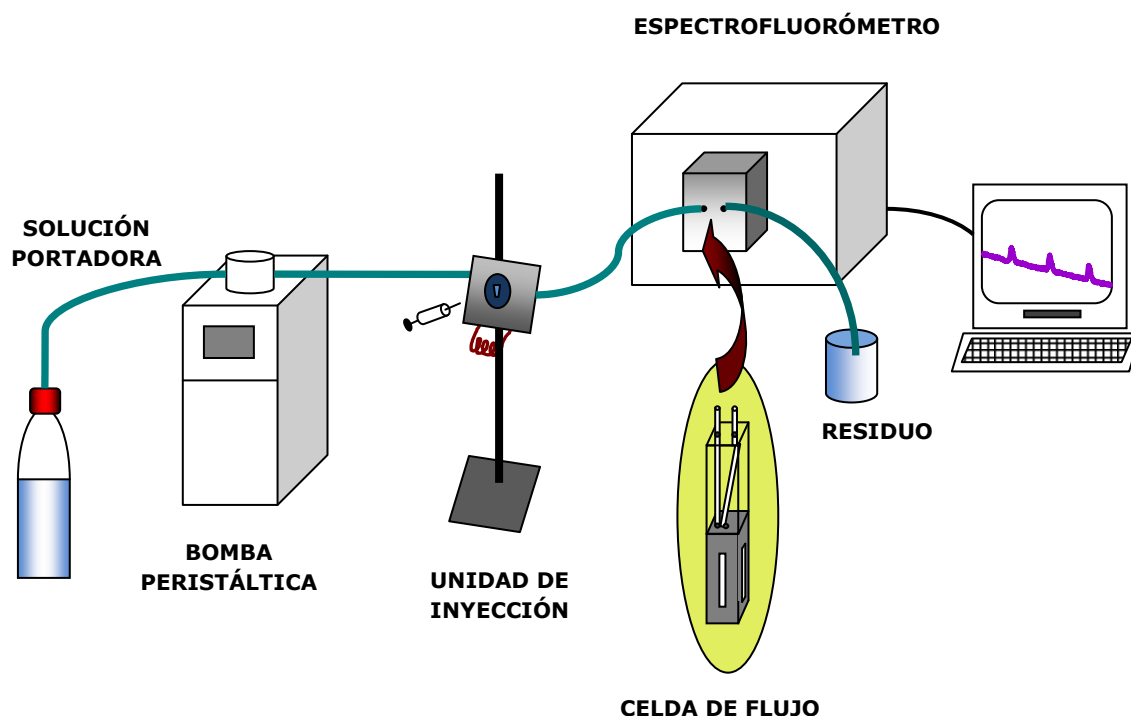
## **A. SISTEMA DE ANÁLISIS EN FLUJO**

### **A.1. Dispositivos de medida**

#### **A.1.a. Sistema de inyección en flujo**

El sistema de flujo utilizado en el desarrollo del optosensor se muestra en la figura 37. El sistema posee una configuración sencilla de flujo de un solo canal, a través del cual la solución portadora es aspirada por medio de una bomba peristáltica.

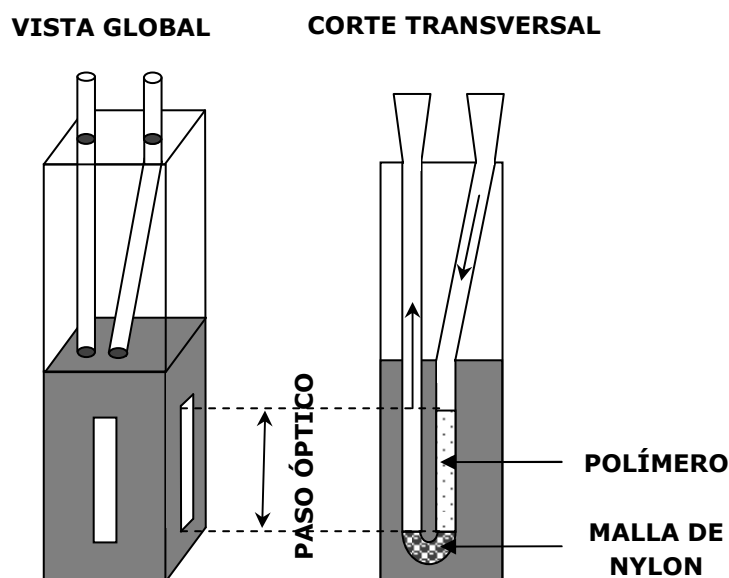
Las muestras se introducen en el flujo por medio de una válvula de inyección de 4 vías, provista de un loop de 500  $\mu$ l, que se encuentra acoplada en serie al sistema de bombeo y son conducidas hacia la celda de flujo. La celda se encuentra dispuesta en el interior del compartimiento de celdas del espectrofotofluorómetro, el cual actúa a modo de sistema de detección. El equipo se encuentra conectado a una PC que permite, a través de un software, el control del equipo, el registro de los datos y su posterior tratamiento.



**Figura 37.** Esquema del dispositivo de medida en flujo.

### A.1.b. Celda de flujo

Se utilizó una celda de flujo convencional, de 25  $\mu\text{l}$  de capacidad, en cuyo interior se empaquetó el polímero impreso de composición óptima para la detección de BZF (ver figura 38).



**Figura 38.** Esquema de la celda de flujo utilizada.

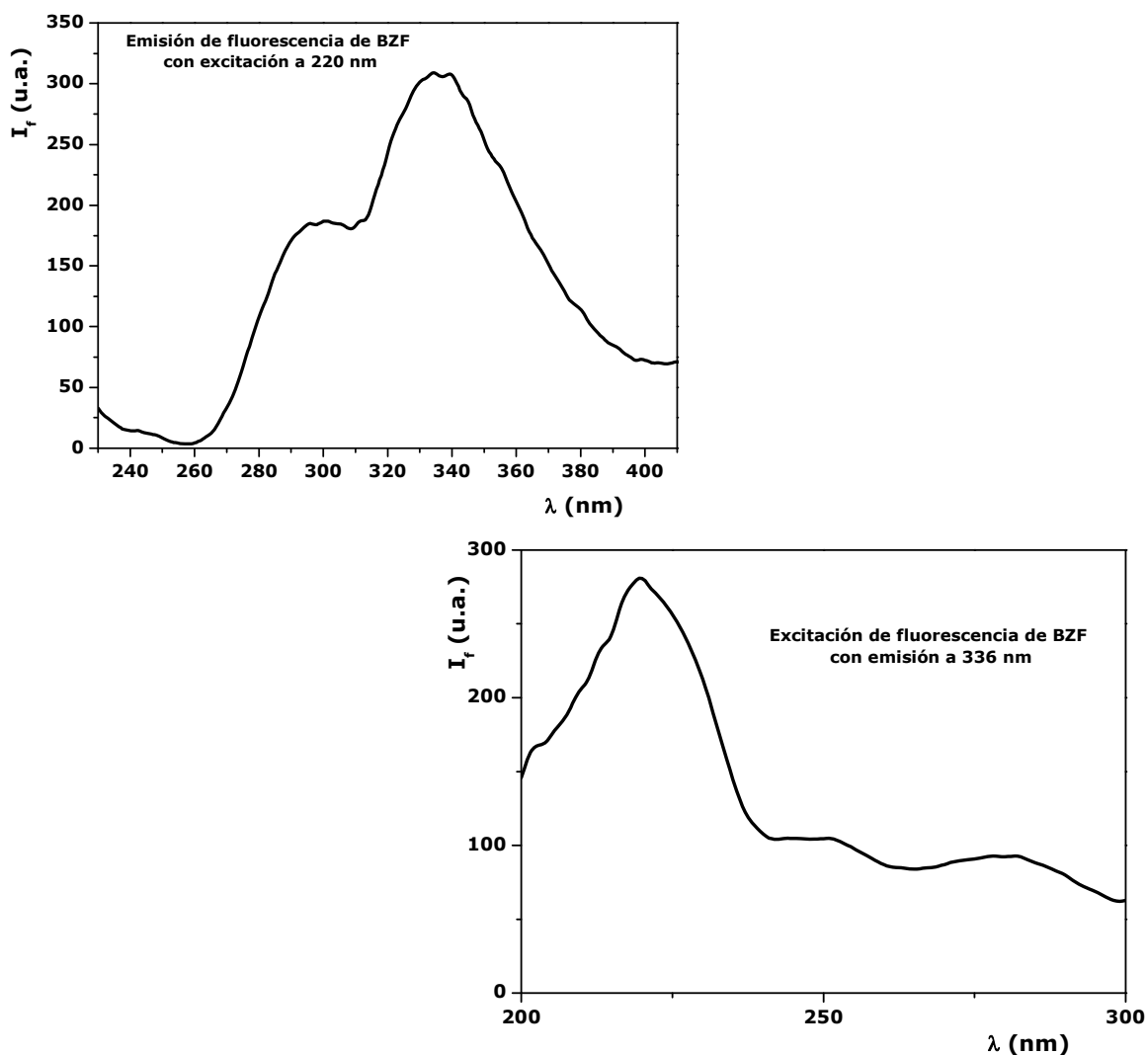
Por el orificio de entrada de la celda se introduce una malla (tela de nylon) que, con la ayuda de una aguja, se acomoda en el fondo de la celda. Luego, con ayuda de un tipo de micropipeta que hace las veces de embudo, se introduce el polímero de forma tal que al humedecerse con la solución portadora abarque todo el paso óptico de la celda.

## A.2. Respuesta del optosensor

### A.2.a. Primera evaluación en flujo

Las primeras experiencias (mencionadas en el capítulo 2, sección B.2.) se encaminaron a probar la capacidad de retención del polímero hacia la BZF.

Se comenzó seleccionando las condiciones instrumentales de operación; se registraron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de una solución  $1,28 \times 10^{-5}$  M de BZF en metanol, utilizando anchos de banda de 10 nm (figura 39).

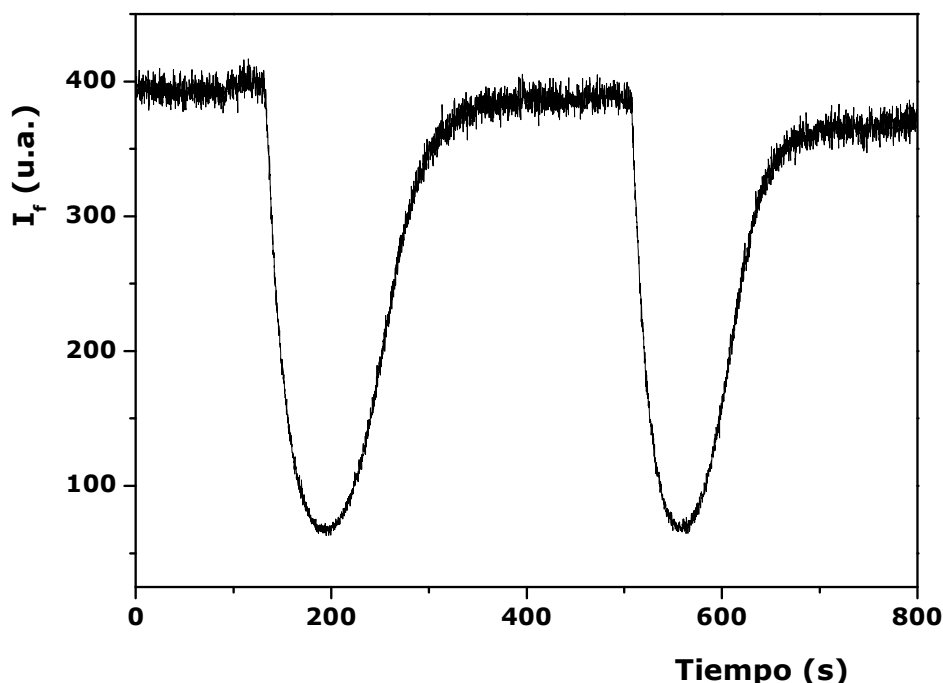


**Figura 39.** Selección de las condiciones instrumentales para la primera evaluación en flujo.

La evaluación en flujo se llevó a cabo utilizando una solución metanol/ácido acético como carrier. El control de la elución se realizó mediante el seguimiento de la señal de fluorescencia a 336nm del polímero empaquetado en la celda de flujo, excitando a 220 nm y utilizando anchos de banda de 10 nm para los monocromadores de excitación y emisión.

Tal como puede observarse en la figura 40, cuando a través del sistema de flujo se bombeó la solución portadora se obtuvo una señal estable del perfil de intensidades a lo largo del tiempo.

Cada vez que se inyectó una solución  $1,28 \times 10^{-5} \text{M}$  de BZF, se observó un pico en la señal (invertido) por un determinado período de tiempo, para luego retornar a la línea de base de la fase móvil.

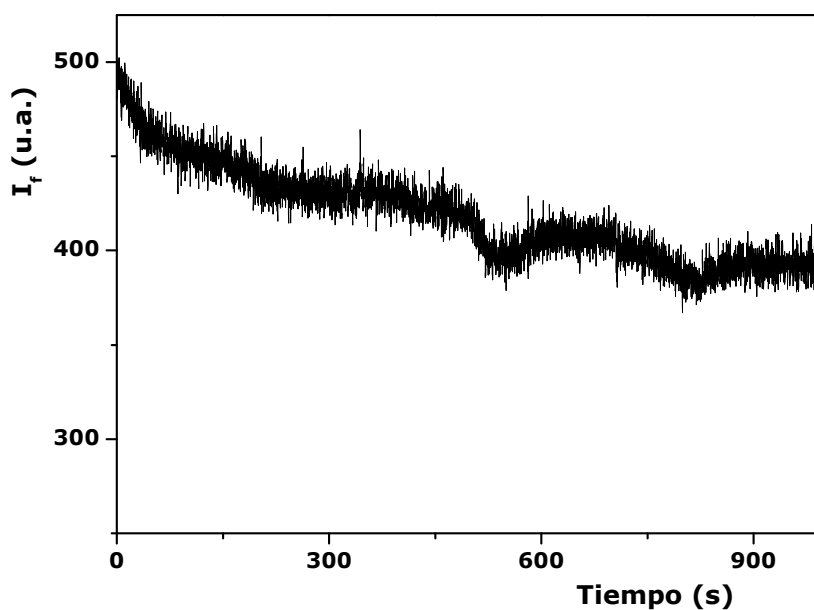


**Figura 40.** Retención / elución de BZF en el interior del polímero impreso.  
Volumen de inyección= 500  $\mu\text{l}$ ; Caudal= 4 ml/min

Evidentemente el polímero es capaz de reconocer y retener las moléculas de BZF por un tiempo durante el cual se registra el pico en la señal. Sin embargo, de manera contraria a lo esperado, no se obtuvieron los picos correspondientes a la emisión de benzofenona.

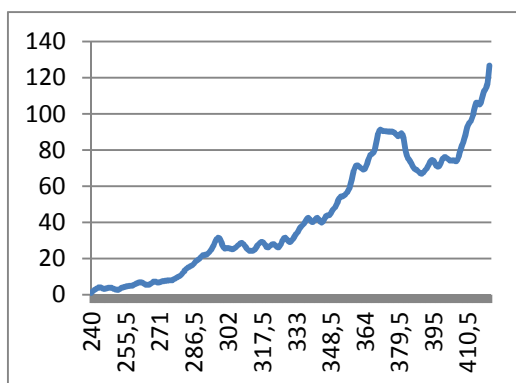
El hecho de que los picos aparezcan invertidos sugiere que dicha interacción "molécula-molde" provoca el quenching de la emisión de fluorescencia del polímero impreso el cual presenta una señal de base independientemente de la solución portadora.

A continuación se llevó a cabo un análisis idéntico pero utilizando el NIP como relleno de la celda de flujo. En este caso, no se observaron cambios apreciables en la línea de base al inyectar la solución  $1,28 \times 10^{-5} \text{M}$  de BZF. Este hecho confirma la retención que el polímero impreso ejerce sobre las moléculas de BZF (figura 41).



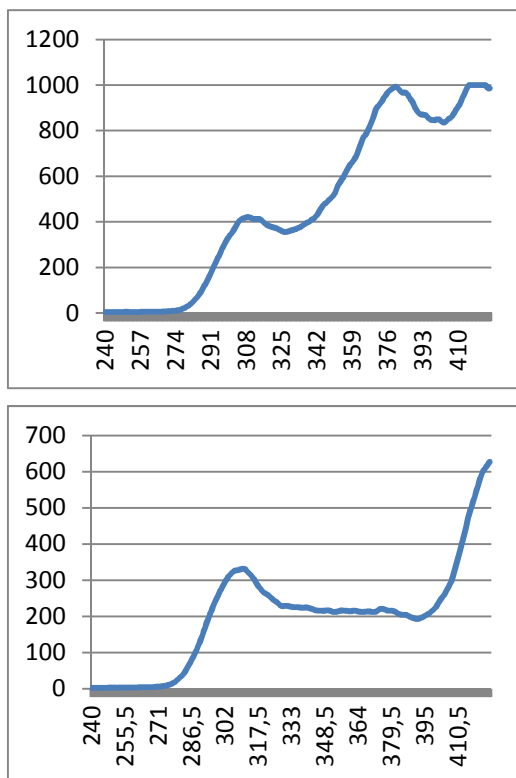
**Figura 41.** Elución de BZF por el interior del polímero no impreso.  
Volumen de inyección= 500µl; Caudal= 4 ml/min.

En la figura 42 se presentan los espectros de emisión de fluorescencia del polímero impreso empaquetado dentro de la celda de flujo en las condiciones utilizadas para la evaluación en flujo. Se estudió en seco, humedecido con metanol y en contacto con la solución de BZF, para lo cual se inyectó el analito y se detuvo el flujo de fase móvil cuando el mismo alcanzó la fase sensora.



**Figura 42.**

**(a)** Espectro de emisión del polímero seco; con excitación a 220 nm.



**Figura 42.**

**(b)** Espectro de emisión del polímero humedecido con metanol; con excitación a 220 nm.

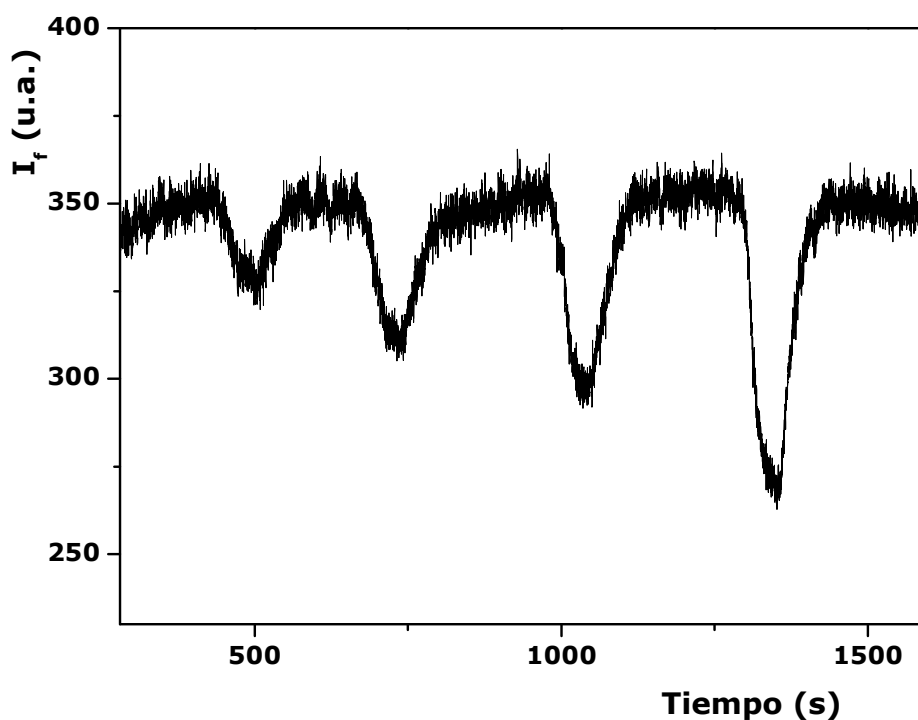
**(c)** Espectro de emisión del polímero en contacto con solución de BZF; excitando a 220 nm.

De las figuras se deduce que la emisión de fluorescencia a 336 nm corresponde al polímero impreso (y no a BZF como se esperaba) y que la adición de BZF al sistema provoca una disminución de la misma.

Resta estudiar si esa disminución en la intensidad de la emisión del polímero impreso responde a los cambios en la concentración de la solución de BZF que se inyecta en el sistema.

### **A.2.b. Respuesta a la concentración de BZF**

En las mismas condiciones en las cuales se realizó el ensayo anteriormente descrito se corroboró la respuesta del optosensor a la concentración de BZF. Se inyectaron soluciones  $1,78 \times 10^{-5}$  M,  $3,40 \times 10^{-5}$  M,  $4,98 \times 10^{-5}$  M y  $7,12 \times 10^{-5}$  M de BZF en metanol (figura 43).



**Figura 43.** Figrama para BZF; volumen de inyección= 500  $\mu$ l; Caudal= 4 ml/min.

Se observa la disminución de la intensidad de la señal del polímero a medida que aumenta la concentración de BZF.

### **A.3. Optimización de las condiciones experimentales del sistema de flujo**

#### **A.3.a. Elección de la solución portadora**

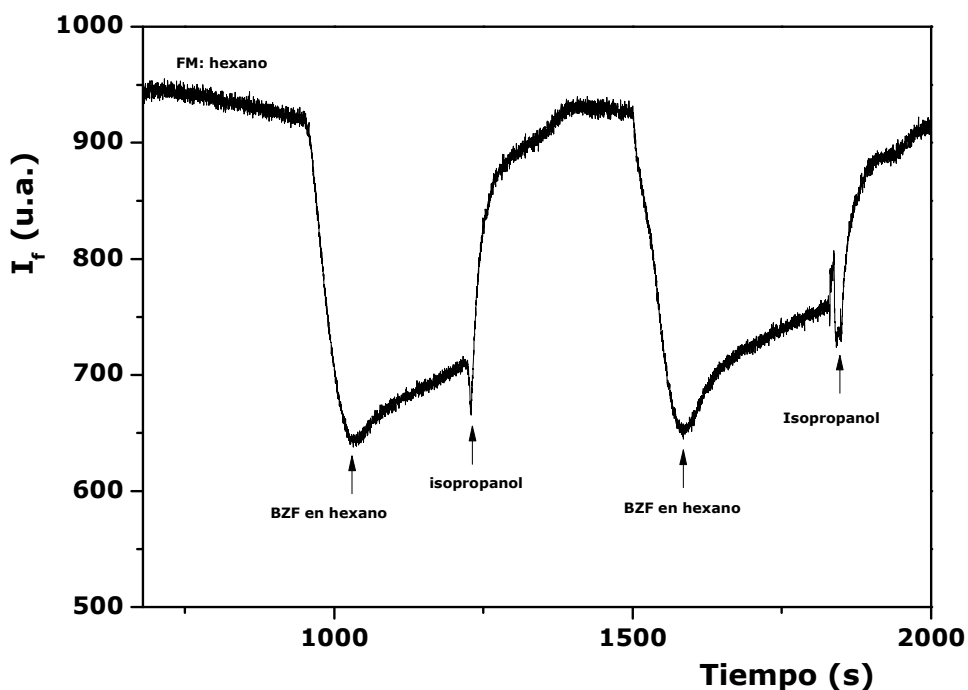
La retención de la BZF sobre el polímero impreso depende de la polaridad relativa de la fase móvil respecto de la fase sensora. Cuando aumenta la polaridad de la primera, crece la tendencia de la BZF a abandonar el polímero e ir hacia la solución portadora, mientras que el uso de una fase móvil apolar permite que la molécula permanezca en el interior del polímero.

Debería utilizarse un solvente apolar para lograr la retención de BZF en el polímero y lograr captar la disminución de fluorescencia del mismo; luego hacer circular un solvente polar que libere la BZF y deje al MIP en las condiciones previas a la inyección de muestra.

Se realizó una prueba utilizando hexano como solvente apolar e isopropanol como solvente polar. Se hizo circular al hexano a través del sistema de flujo (fase móvil) y se realizaron inyecciones de una solución  $3,40 \times 10^{-5}$  M de BZF en hexano seguidas de inyecciones de isopropanol.

Para llevar a cabo el ensayo se modificaron las longitudes de onda de excitación y emisión en función de los nuevos disolventes utilizados, se analizó el comportamiento de una solución de BZF en isopropanol-hexano sobre el polímero encontrándose las nuevas condiciones de trabajo. Se utilizaron 410 nm y 515 nm como longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente y ranuras de 10 nm y 5 nm para los monocromadores de excitación y emisión, respectivamente.

Como se aprecia en la figura 44, cuando se inyecta la solución de BZF en hexano el polímero es capaz de retenerla y se observa una disminución en la intensidad de la fluorescencia de base, se genera un pico invertido y luego se estabiliza la señal; la inyección subsiguiente de isopropanol permite la elución completa de la BZF del interior del polímero y la recuperación de la línea de base.



**Figura 44.** Perfil de respuesta en flujo obtenido.



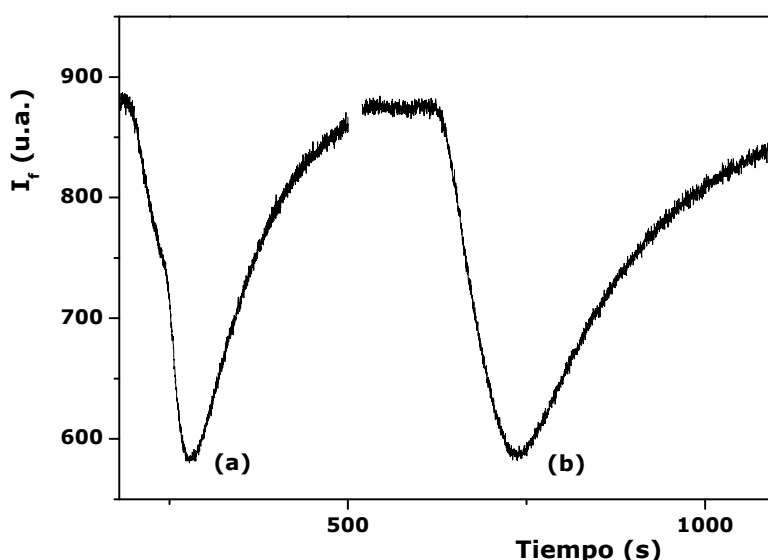
El cambio de solución portadora requiere de cierto tiempo el cual hace que los picos presenten cola debido a una retención prolongada, además de no ser una opción práctica.

El siguiente paso consistió en buscar una fase móvil que fuese capaz de permitir que la BZF interactuara con el polímero para lograr su reconocimiento (selectividad) pero que tenga también la capacidad de recuperar las condiciones iniciales sin necesidad de cambiar de solvente (reversibilidad).

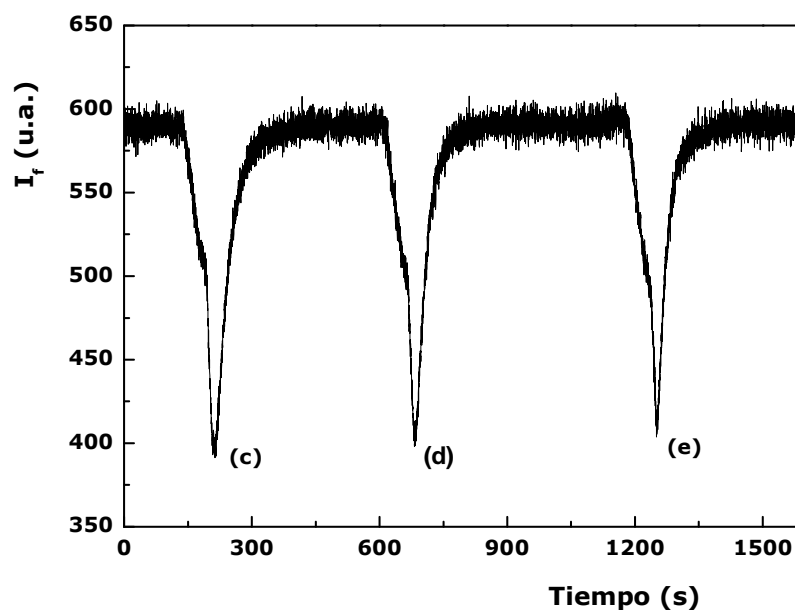
Ya que habíamos comprobado la capacidad del hexano para favorecer la interacción molécula-molde y el poder eluyente del isopropanol, aprovechamos la buena miscibilidad entre ellos para utilizar una mezcla de ambos como solución portadora.

Con la mezcla hexano/isopropanol se ensayaron distintas proporciones, con la finalidad de variar la polaridad de la solución resultante y con ello analizar los cambios generados tanto en la intensidad como en la forma de los picos.

Se realizaron inyecciones de una solución de BZF  $3,40 \times 10^{-5}$  M utilizando como solución portadora las mezclas hexano/isopropanol 90:10 (v:v), 80:20 (v:v), 70:30 (v:v), 50:50 (v:v) y 30:70 (v:v). Ver figuras 45 y 46.



**Figura 45.** Inyecciones de BZF utilizando como solución portadora isopropanol/hexano: (a) 10:90 (v:v) y (b) 20:80 (v:v).



**Figura 46.** Inyecciones de BZF utilizando como solución portadora isopropanol/hexano: (c) 30:70 (v:v) (d) 50:50 (v:v) y (e) 70:30 (v:v).

El resultado obtenido usando la mezcla de solventes fue positivo; en todos los casos se observa que al momento de la inyección de BZF se alcanza un mínimo de manera muy rápida para luego recuperar paulatinamente la línea de base.

Como era de esperar, al aumentar la proporción de isopropanol disminuyó el ancho de los picos (al ser la mezcla más polar, la BZF eluye con mayor rapidez del polímero) pero disminuyó también la intensidad de los mismos (menor interacción).

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó para su posterior utilización la solución portadora compuesta por hexano/isopropanol en proporciones 90:10 (v:v).

### **A.3.b. Selección del caudal de flujo**

Es necesario optimizar también la velocidad de flujo de la solución portadora. Para ello se analizaron las señales obtenidas al inyectar una solución de BZF  $3,40 \times 10^{-5}$  M variando el flujo dentro de un intervalo que consideramos apropiado teniendo en cuenta experiencias anteriores (si se

utiliza todo el intervalo que ofrece la bomba peristáltica, al llegar a velocidades demasiado altas se puede llegar a expulsar al MIP de la celda).

De los resultados se dedujo que, al igual que lo que ocurre al aumentar la polaridad de la fase móvil, un aumento en la velocidad de flujo produce un angostamiento en los picos pero a su vez provoca una disminución en la intensidad de la señal debido a una menor retención.

Para experiencias posteriores se seleccionó un caudal de 5ml/min como solución de compromiso.

#### **A.4. Condiciones para el análisis por inyección en flujo**

A continuación se presenta un resumen de las condiciones de operación para el análisis por inyección en flujo.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>VALOR SELECCIONADO</b>
Longitud de onda de excitación	410 nm
Longitud de onda de emisión	515 nm
Ancho de banda de excitación	10 nm
Ancho de banda de emisión	5 nm
Solución portadora	isopropanol/hexano 10:90 (v:v)
Volumen de inyección	500 µL
Velocidad de flujo	5 ml/min
Temperatura	Ambiente

**Tabla 13.** Condiciones experimentales seleccionadas para el análisis en flujo.

## **B. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL ENSAYO**

### **B.1. Curvas de calibración**

Dado que la idea del presente trabajo es la determinación de OXA en forma de su derivado de hidrólisis (BZF), se evaluaron dos tipos de curvas de calibración:

**Curva 1:** utilizando soluciones patrones de BZF.

Se prepararon soluciones de BZF en ácido clorhídrico 3M de concentraciones  $1,497 \times 10^{-5}$  M;  $2,995 \times 10^{-5}$  M;  $4,493 \times 10^{-5}$  M y  $6,002 \times 10^{-5}$  M.

Sobre 3 ml de cada una de ellas (analizadas por duplicado) se realizó una extracción con 3 ml de hexano ( $V_o=V_{aq}$ ), para poder ser inyectadas al flujo (no es conveniente inyectar soluciones ácidas en el MIP debido a que disminuye la interacción molécula-molde).

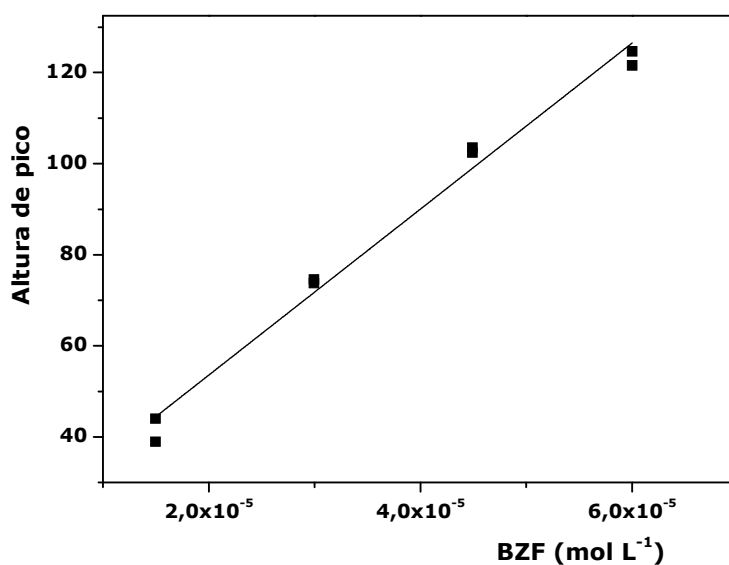
**Curva 2:** utilizando soluciones patrones de OXA hidrolizadas.

Se prepararon soluciones de OXA en ácido clorhídrico 3M de concentraciones  $1,493 \times 10^{-5}$  M;  $2,998 \times 10^{-5}$  M;  $4,503 \times 10^{-5}$  M;  $5,996 \times 10^{-5}$  M. Las mismas fueron sometidas a calentamiento a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Una vez producida la reacción de hidrólisis se utilizaron 3 ml de cada una de las soluciones resultantes (analizadas por duplicado) para ser sometidas a una extracción con 3 ml de hexano.

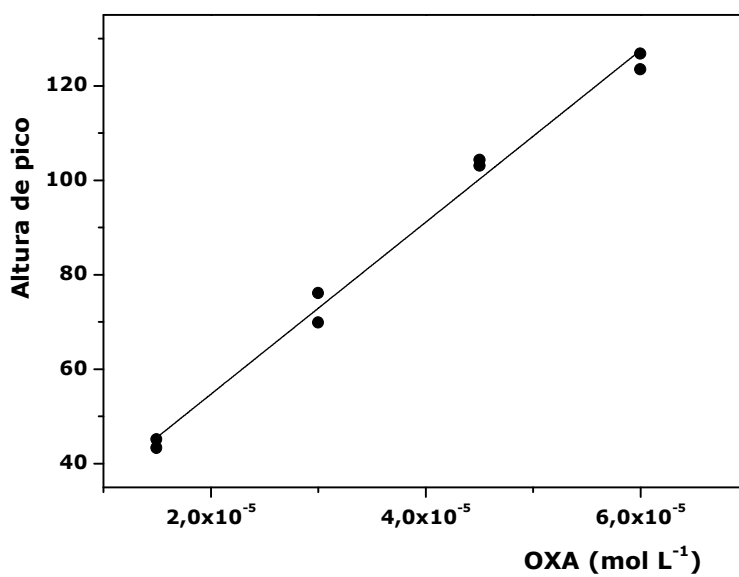
Las soluciones de BZF en hexano obtenidas por separación de la fase orgánica fueron evaluadas en las condiciones óptimas de funcionamiento del sistema en flujo.

Se inyectaron las soluciones y se midieron las alturas de los picos registrados para cada concentración en ambos tipos de curvas.

Con las series de datos obtenidos se graficaron las curvas de calibración las cuales muestran un comportamiento lineal. Las ecuaciones para cada curva se obtuvieron por el método de ajuste de mínimos cuadrados. Las rectas obtenidas se muestran en las figuras 47 y 48.



**Figura 47.** Curva de calibración 1.



**Figura 48.** Curva de calibración 2.

La representación de las rectas toma la expresión algebraica  $y = a + bx$ . La tabla 14 exhibe los resultados del análisis de regresión para ambas curvas de calibración, en donde:

$n$  = número de datos de calibración;

$a$  = ordenada en el origen;

b= pendiente de la recta;

r= coeficiente de correlación;

$s_{y/x}$  = varianza residual de la recta,  $s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$ ;

$s_a$  y  $s_b$ = desviaciones estándar para la ordenada en el origen y la pendiente

respectivamente,  $s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$  y  $s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$ .

Curva	n	Ordenada $\pm s_a$	Pendiente $\pm s_b$	$S_{y/x}$	r
1	8	17,1 $\pm$ 3,6	1822440 $\pm$ 86896	4,13	0,9932
2	8	18,3 $\pm$ 2,8	1819630 $\pm$ 68860	3,27	0,9957

**Tabla 14.** Resultados del análisis de regresión para las curvas 1 y 2.

A continuación se llevó a cabo una prueba estadística sencilla para verificar que los coeficientes de correlación obtenidos en ambas rectas fuesen realmente significativos de modo de poder asegurar que la representación gráfica de la calibración es lineal. Se realizó un test de hipótesis, en el cual la hipótesis nula es que "no existe correlación lineal entre los valores de x e y". Se calculó el valor de t de acuerdo a la ecuación [165]:

$$t = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Los valores calculados de t se comparan con los valores tabulados al valor de significación deseado, usando una prueba t de dos colas y (n-2) grados de libertad.

En nuestro caso,

Curva 1:

$$t_{\text{exp}} = 29,60$$

$$t_{\text{crit}} (95\%, 6) = 2,45$$

Curva 2:

$$t_{\text{exp}} = 37,27$$

$$t_{\text{crit}} (95\%, 6) = 2,45$$

Dado que  $t_{exp}$  es mayor que el tabulado, se rechaza la hipótesis nula, es decir, se concluye que existe una correlación significativa entre los valores de x e y en ambas curvas.

### Ensayo de comparación de pendientes

Dadas las pendientes de dos rectas de calibración, se las puede comparar mediante una prueba de significación t. El valor de t experimental puede calcularse utilizando la expresión:

$$t_{exp} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s_{ep}^2 \left( \frac{1}{\sum(x_{i1} - \bar{x})^2} + \frac{1}{\sum((x_{i2} - \bar{x})^2)} \right)}}$$

Donde  $b_1$  y  $b_2$  son las pendientes de la curvas 1 y 2 respectivamente, y la varianza residual se calcula según:

$$s_{ep}^2 = \frac{(n_1 - 2) s_{x/y1}^2 + (n_2 - 2) s_{x/y2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

Si las varianzas residuales de ambas rectas ( $s_{x/y1}^2$  y  $s_{x/y2}^2$ ) son comparables, t crítico se busca en tabla con  $n_1+n_2-4$  grados de libertad y el nivel de significación deseado.

En nuestro caso,

$$\sum (y_{i1} - \hat{y}_{i1})^2 = 102,2$$

$$\sum (y_{i2} - \hat{y}_{i2})^2 = 64,06$$

$$S_{e1}^2 = 17,030$$

$$S_{e2}^2 = 10,676$$

$$\sum (x_{i1} - \bar{x})^2 = 2,253 \times 10^{-9}$$

$$\sum (x_{i1} - \bar{x})^2 = 2,254 \times 10^{-9}$$

Entonces,

$$s_{ep}^2 = 13,85$$

$$t_{exp} = 0,025$$

$$t_{crit(95\%, 12)} = 2,179$$

Dado que  $t_{exp}$  es menor a  $t_{crit}$  podemos decir, con un nivel de confianza del 95%, que ambas pendientes no difieren entre sí.

Se puede utilizar la curva preparada con las soluciones patrones de BZF para determinar el contenido de OXA de una muestra incógnita (previa hidrólisis de la misma) y así evitar la complicación experimental que acarrea tener que hidrolizar todas las soluciones patrones para poder realizar la curva.

## **B.2. Intervalo lineal**

El intervalo lineal es el rango de concentración del analito en el cual el método se comporta linealmente. El intervalo lineal se estimó a partir del análisis de regresión del gráfico de calibración, llevando a cabo un test F de falta de ajuste [166]. Se detectó linealidad en todo el intervalo de trabajo, comprendido entre  $1,5 \times 10^{-5}$  M y  $6,0 \times 10^{-5}$  M.

## **B.3. Límites de detección y cuantificación**

El límite de detección ( $L_D$ ) [167] puede definirse como *“la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada con un grado de certeza específico”*. El límite de cuantificación ( $L_Q$ ) es *“la menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con un nivel de precisión y exactitud aceptable”*.

El límite de detección depende de la señal del blanco ( $\mu_B$ ), de la dispersión de la respuesta del blanco ( $\sigma_B$ ) y de la definición de dos riesgos: riesgo de tipo  $\alpha$  de detectar la presencia de analito cuando realmente está ausente y riesgo de tipo  $\beta$  de no detectar al analito cuando de hecho está presente [168]. Considerando que las medidas se distribuyen normalmente, que  $\sigma$  en el límite de detección es igual a  $\sigma_B$  y definiendo  $\alpha=\beta=0,05$ , el límite de detección puede expresarse como:

$$L_D = 3,29 \left( \frac{\sigma_B}{b} \right)$$

Donde  $b$  es la pendiente de la recta de calibración.

El límite de cuantificación está dado por:

$$L_Q = k \left( \frac{\sigma_B}{b} \right)$$

IUPAC [169] propone un valor de  $k=10$ .



Con el método propuesto no es factible medir experimentalmente la desviación estándar del blanco, por lo tanto se aplicó un método alternativo basado en la curva de calibración [165]; en el cual se utiliza la desviación estándar de la recta de calibración  $S_{y/x}$  en lugar de  $\sigma_B$  en la estimación del  $L_D$ .

Utilizando los datos tabulados previamente para la curva 1 se obtiene un límite de detección de  $6,79 \times 10^{-6}$  M.

Para el método en análisis el límite de cuantificación es de  $2,26 \times 10^{-5}$  M.

#### **B.4. Repetibilidad del método**

La precisión indica el *grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el mismo procedimiento experimental, repetidas veces, sobre una misma muestra homogénea.* La precisión de un método puede estimarse de varias formas [170]:

- *Repetibilidad del método:* grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado repetidamente por el mismo analista, en el mismo equipo y en un período corto de tiempo.

- *Precisión intermedia:* grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando se realizan pequeñas variaciones en el laboratorio como distintos días, diferentes analistas o equipos.

- *Reproducibilidad:* grado de concordancia entre resultados obtenidos cuando el método es aplicado en distintos laboratorios.

Para el estudio de la repetibilidad del método se preparó una solución madre de OXA de concentración  $3,20 \times 10^{-4}$  M, a partir de la cual se prepararon 10 muestras de concentración  $3,20 \times 10^{-5}$  M. Las mismas fueron evaluadas en las condiciones óptimas de funcionamiento del sistema en flujo y las condiciones de trabajo se mantuvieron constantes (todas las muestras fueron preparadas e inyectadas el mismo día y por el mismo analista). Se obtuvieron los resultados que se presentan a continuación.

Alturas de pico de las muestras: 75,2; 78,0; 76,7; 77,1; 74,6; 73,7; 74,2; 76,1; 75,3; 72,5.

Concentraciones de OXA halladas utilizando los datos de regresión de la curva 1:  $3,19 \times 10^{-5}$  M;  $3,34 \times 10^{-5}$  M;  $3,27 \times 10^{-5}$  M;  $3,29 \times 10^{-5}$  M;  $3,15 \times 10^{-5}$  M;  $3,10 \times 10^{-5}$  M;  $3,13 \times 10^{-5}$  M;  $3,23 \times 10^{-5}$  M;  $3,19 \times 10^{-5}$  M;  $3,04 \times 10^{-5}$  M.

Con los resultados mencionados se calculó el coeficiente de variación experimental, CV (también puede expresarse como desviación estándar relativa, RSD%), utilizando la siguiente expresión:

$$CV (\%) = \frac{S_{n-1}}{\bar{x}}$$

Donde,

$S_{n-1}$  = desviación estándar de las medidas =  $9,20 \times 10^{-7}$  M

$\bar{x}$  = media de las concentraciones calculadas utilizando la recta de regresión =  $3,193 \times 10^{-5}$  M.

El coeficiente de variación arrojó un valor de 2,88 %.

Según Horwitz [171], en la determinación de cualquier tipo de muestra, la precisión interlaboratorio del método analítico se considera aceptable cuando su CV experimental es inferior al calculado con la siguiente ecuación teórica:

$$\% CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Donde c es la concentración del analito expresada en g/ml.

Asimismo se considera la precisión intralaboratorio aceptable cuando el valor de CV experimental es inferior a  $\frac{1}{2}$  del CV obtenido al aplicar la ecuación anterior.

De esta manera, para la concentración de analito estudiada ( $7,4 \times 10^{-6}$  g/ml), se obtiene un coeficiente de variación teórico de Horwitz de 11,83 %. El CV experimental hallado es inferior a 5,92% por lo que se puede considerar que la precisión del método utilizado es satisfactoria.

## **B.5. Estabilidad de la fase sensora**

La fase sensora seleccionada como óptima demostró una elevada estabilidad ya que durante su utilización no se presentaron cambios importantes en la estabilidad de las señales. Tanto los ensayos de calibración como los análisis de muestras reales fueron realizados utilizando

la misma fase sensora para evitar variaciones en las medidas debido al cambio de polímero. Dichos ensayos se llevaron a cabo durante un período de 8 meses, durante el cual la fase sensora no fue removida de la celda de flujo. Podemos afirmar que la estabilidad de la fase sensora es superior a 8 meses.

## **C. APLICACIÓN ANALÍTICA**

### **C.1. Determinación de OXA en compuestos farmacéuticos**

Para estudiar la aplicabilidad del método propuesto a muestras reales se analizó una formulación farmacéutica comercial de oxazepam (Pausafren T, 15 mg; comprimidos con microgránulos).

Para la evaluación cuantitativa del analito se utilizó un método que permite la corrección por efectos de matriz siguiendo un trabajo realizado por R.C. Castells y M.A.Castillo [172].

Se requiere de tres experiencias de calibración (calibración con patrones, calibración por el método de adiciones estándar y calibración de Youden) para obtener el conjunto de datos necesarios para llevar a cabo el estudio correspondiente [173-175].

**Preparación de la muestra:** se pesaron cinco comprimidos de Pausafren T para obtener la masa promedio de los mismos, la cual resultó ser de 1,150 g. Los comprimidos se molieron en mortero de ágata y se homogenizaron.

**Calibración con soluciones patrones de BZF:** para obtener el gráfico de calibración estándar se transfirieron alícuotas crecientes de una solución madre de BZF  $1,2474 \times 10^{-3}$  M sobre una serie de matraces de 10,0 ml, enrasando luego los mismos con solución de ácido clorhídrico 3M. Se obtuvieron soluciones de concentración final comprendidas en el rango de  $1,25 \times 10^{-5}$  M y  $7,50 \times 10^{-5}$  M las cuales fueron sometidas a extracción con n-hexano, inyectadas al flujo y evaluadas en las condiciones óptimas de análisis.

**Calibración por el método de adiciones estándar:** sobre distintas porciones de muestra 0,300 g cada una se adicionaron masas crecientes de OXA y se llevaron a 10,0 ml con ácido clorhídrico 3M. Las soluciones obtenidas se sometieron a la reacción de hidrólisis. Los sobrenadantes resultantes se diluyeron (1 ml de cada sobrenadante fue llevado a 10 ml con ácido clorhídrico 3M) y se extrajeron con hexano previamente a su inyección en el sistema de flujo.

**Calibración de Youden**: se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la calibración por el método de adiciones estándar pero utilizando cantidades variables de muestra (entre 0,25 y 1,10 g).

La tabla 15 muestra los parámetros estadísticos obtenidos al aplicar regresión lineal por mínimos cuadrados a las representaciones de las calibraciones por patrones (respuestas obtenidas versus concentración molar de BZF) y por el método de adiciones estándar (respuestas obtenidas versus concentración molar de OXA adicionado).

<b>Calibración</b>	<b>n</b>	<b>Ordenada <math>\pm s_a</math></b>	<b>Pendiente <math>\pm s_b</math></b>	<b><math>S_{y/x}</math></b>	<b>r</b>
<b>Estándar</b>	12	15 $\pm$ 2	1288370 $\pm$ 44686	3,30	0,9934
<b>Adiciones std</b>	10	23,6 $\pm$ 0,9	1194120 $\pm$ 33398	1,60	0,9965

**Tabla 15.** Resultados del análisis de regresión para las calibraciones con soluciones patrones y por adiciones estándar.

Se observa una diferencia entre las rectas, la cual fue corroborada por un ensayo de comparación de pendientes como el descrito en B.1.b.

La diferencia entre las rectas de calibración evidencia un efecto de interacción analito-matriz, es decir, existe una modificación de la señal del analito debido a la presencia de otros componentes en la muestra.

De acuerdo al trabajo de Castells y Castillo, las matrices pueden afectar la respuesta del analito por dos mecanismos diferentes: algún componente de la matriz, presente en el momento de la medición, modifica de alguna manera la respuesta del analito, o, algún tratamiento que recibe la muestra previamente a la medición y que no es necesario en la calibración estándar (en nuestro caso puede ser la extracción con hexano) puede resultar en un efecto de matriz.

En la **calibración estándar (CS)**, la respuesta obtenida puede describirse con el modelo:

$$y_{i,S} = \beta_{0,S} + \beta_{1,S}w_i + \varepsilon_i \quad (1)$$

Donde  $y_{i,S}$  es la respuesta medida,  $\varepsilon_i$  es el error experimental aleatorio en el nivel  $w_i$ ,  $\beta_{1,S}w_i$  es la respuesta real del analito y  $\beta_{0,S}$  es un error constante, independiente de la concentración del analito.

El resultado del procedimiento de ajuste es:

$$\hat{y}_{i,S} = b_{0,S} + b_{1,S}w_i \quad (2)$$

$$b_{0,S} \in \beta_{0,S} \quad (3)$$

$$b_{1,S} \in \beta_{1,S} \quad (4)$$

donde  $\hat{y}_{i,S}$  es la respuesta predicha al nivel  $w_i$ ,  $b_{0,S}$  representa la extrapolación a  $w_i=0$  de las respuestas en presencia de una cantidad finita de analito y  $\varepsilon$  significa " es la estima de".

Cuando existen efectos de matriz, la respuesta obtenida puede ser descrita con la siguiente expresión:

$$y_{i,S} = \beta_{0,S} + \beta_{0,M} + \beta_{1,S}Pw_i + \varepsilon_i \quad (5)$$

Donde  $\beta_{0,M}$  es un error de matriz constante, independiente de la cantidad de muestra cuyo origen es análogo al de  $\beta_{0,S}$  y P es un término que explica los efectos de matriz en la respuesta del analito. Un valor de P constante representa un efecto de matriz proporcional a la cantidad de analito pero independiente de la cantidad de matriz.

La gráfica de una **calibración de Youden (CY)** es la representación de las respuestas  $y_i$  contra w (masa de muestra). Sustituyendo  $w_i$  por w en la ecuación (5) se obtiene el modelo de respuesta para la CY.

$$y_i = \beta_{0,S} + \beta_{0,M} + \beta_{1,S}P x_i w + \varepsilon_i \quad (6)$$

En donde  $x_i = w_i/w$  representa la fracción en peso de analito en la muestra. El resultado de las respuestas obtenidas en una CY para este modelo es:

$$\hat{y}_i = b_{0,CY} + b_{1,CY}w \quad (7)$$

$$b_{0,CY} \in \beta_{0,S} + \beta_{0,M} \quad (8)$$

$$b_{1,CY} \in \beta_{1,S}P x_i \quad (9)$$

Combinando (3) y (8)

$$b_{0,CY} - b_{0,S} \approx b_{0,M} \in \beta_{0,M} \quad (10)$$

de (4) y (9)

$$b_{1,CY} = b_{1,S} P_{xi} \quad (11)$$

$b_{0,CY}$  es el blanco total de Youden; este contiene las señales de respuesta  $b_{0,S}$  más aquellas que aparecen por algún pre-tratamiento de la muestra;  $b_{0,M}$  es el blanco de Youden.

En la **calibración por adiciones estándar (CAS)** se representan las respuestas obtenidas versus la masa de analito adicionada  $w_{i,ad}$ . Sustituyendo en la ecuación (5),

$$y_{i,CAS} = \beta_{0,S} + \beta_{0,M} + \beta_{1,S}P(w_i + w_{ad}) + \varepsilon_i \quad (12)$$

Donde  $w_i$  es la masa de analito presente en la cantidad de muestra  $w$ . Entonces,

$$\hat{y}_{i,CAS} = b_{0,CAS} + b_{1,CAS}w_{i,ad} \quad (13)$$

$$b_{0,CAS} \in \beta_{0,S} + \beta_{0,M} + \beta_{1,S}Pw_i \quad (14)$$

$$b_{1,CAS} \in \beta_{1,S}P \quad (15)$$

de las ecuaciones (4) y (15),

$$b_{1,CAS} = b_{1,S}P \quad (16)$$

de (4), (8) y (14),

$$b_{0,CAS} = b_{0,CY} + b_{1,S}Pw_i \quad (17)$$

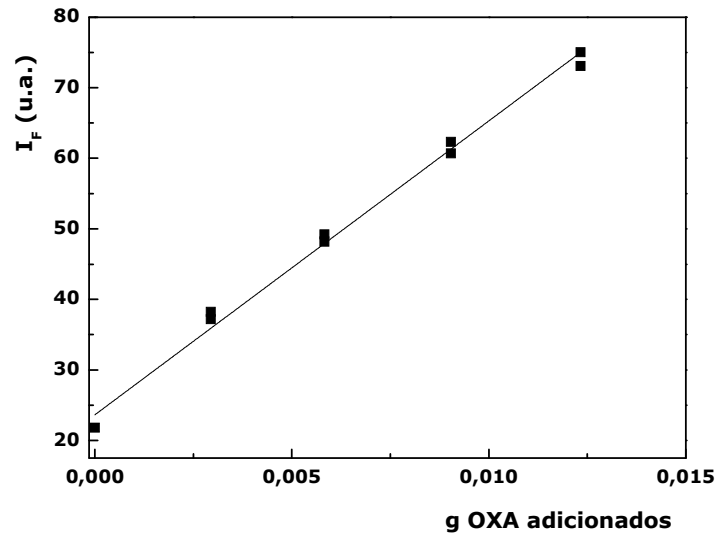
De la ecuación (16) se deduce que una diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes de la CS y la CAS indica un efecto analito-matriz de primer orden, y que dos CAS llevadas a cabo con distinta cantidad de muestra resultará en dos rectas paralelas.

### C.1.a. Cálculo de la composición de muestra

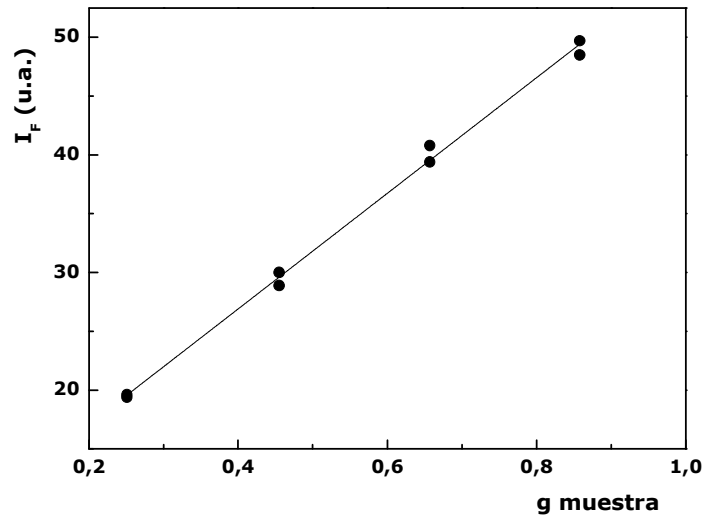
Una de las opciones para calcular la composición de la muestra es utilizar los datos de las calibraciones por adiciones estándar y de Youden. De las ecuaciones (16) y (17) resulta la expresión (18):

$$x_i = \frac{(b_{0,CAS} - b_{0,CY})}{b_{1,CAS}w}$$

Las figuras 49 y 50 muestran las gráficas de las calibraciones por adiciones estándar y de Youden, respectivamente. En la tabla 16 se resumen los resultados de los análisis de regresión para cada curva.



**Figura 49.** Curva de calibración por adiciones estándar.



**Figura 50.** Curva de calibración de Youden.



<i>Calibración</i>	<i>n</i>	<i>Ordenada ± s<sub>a</sub></i>	<i>Pendiente ± s<sub>b</sub></i>	<i>S<sub>y/x</sub></i>	<i>r</i>
<b>Adiciones std</b>	10	23,6 ± 0,9	4165 ± 116	20,52	0,9969
<b>Youden</b>	8	7,2 ± 0,7	49 ± 1	3,22	0,9984

**Tabla 16.** Resultados del análisis de regresión para las calibraciones de Youden y por adiciones estándar.

Utilizando la ecuación (18) y los datos obtenidos de las calibraciones por adiciones estándar y de Youden se calculó el contenido de OXA en la formulación analizada el cual arrojó un resultado de 15,08 mg/comprimido.

El error del valor calculado se estimó utilizando la expresión de cálculo aproximada para la desviación estándar que se muestra a continuación y calculando los límites de confianza como  $x \pm ts$ , con (n-2) grados de libertad.

Entonces,

$$s = \frac{S_{y/x}}{b} \left\{ \frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum(x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$$

donde los términos tienen los significados habituales, anteriormente mencionados. Utilizando dicha expresión se obtiene un valor para  $ts$  igual a 0,949 mg. El resultado del análisis puede expresarse como 15,1 ± 0,9 mg / comprimido.

El resultado obtenido concuerda con el contenido declarado por el fabricante (15 mg por comprimido).

El resultado del ensayo puede considerarse muy satisfactorio si se tiene en cuenta que la formulación contiene 500 mg de β-alanina (ácido 3-aminopropanoico) por comprimido. El grupo amino de dicho aminoácido podría interferir en el reconocimiento de la BZF al interaccionar con el MAA; evidentemente no lo hace y de esta manera se corrobora la selectividad del polímero impreso hacia la molécula molde de BZF.



### **III**

---

## **CONCLUSIONES**



- Se determinó que el mecanismo de "quenching" de la fluorescencia de seroalbúmina bovina por tres benzodiazepinas es consistente con el modelo estático y que las reacciones de unión son espontáneas.
- Se investigó el tipo de interacción bajo condiciones fisiológicas, pudiendo determinarse que la formación de puentes de hidrógeno y las fuerzas de tipo van der Waals e hidrofóbica son las de mayor importancia en la interacción benzodiazepina-SAB.
- Se obtuvieron las constantes de unión, las fuerzas de enlace, las distancias de unión y los parámetros de transferencia de energía para cada sistema droga-SAB. A través de los espectros de fluorescencia sincrónica se verificó que la estructura secundaria de la seroalbúmina se ve afectada ante la presencia de benzodiazepinas.
- Se estudiaron las condiciones de hidrólisis de la benzodiazepina oxazepam y se sintetizaron polímeros impresos con el derivado de hidrólisis de dicho compuesto.
- Se optimizaron las condiciones de síntesis del proceso de impresión de la 2-amino,5-clorobenzofenona, evaluando las propiedades de reconocimiento selectivo de los polímeros obtenidos y seleccionando al que arrojó mejores resultados.
- Se utilizó el polímero impreso seleccionado como fase sensora para la determinación indirecta de oxazepam en flujo. Se optimizaron las condiciones del sistema en flujo.
- Se evaluó el desempeño analítico del ensayo para la determinación de benzodiazepinas. Se analizó una muestra real obteniéndose muy buenos resultados.



## **IV**

---

## **REFERENCIAS**





- [1] C. Page, C. Michael, M. Sutter, M. Walker, B.B. Hoffman, *Integrated Pharmacology*, 2nd ed. C.V. Mosby, Amsterdam, 2002.
- [2] B. Brands, B. Sproule, J. Marshman, *Drugs & Drug Abuse*, 3rd ed. Addiction Research Foundation, Toronto, Canada, 1998.
- [3] P. Danneberg, K.H. Weber, *Br. J. Clin. Pharmacol* 16 (1983) 231.
- [4] N. Suryakiran, K. Rajesh, P. Prabhakar, J. Selvam, Y. Venkateswarlu, *Cataly. Communi.* 8 (2007) 1635.
- [5] I. Capanec, M. Litvic, I. Pogorelic, *Org. Process Res. & Devel.* 10 (2006) 1192.
- [6] M. Pozarentzi, J. Stephanidou-Stephanatou, C.A. Tsoleridis, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 1755.
- [7] P.M. Afzal, J.P. Vaderapura, *Heterocycles* 68 (2006) 1017.
- [8] D.R. Abernethy, D.J. Greenblatt, H.R. Ochs, *Curr. Med. Res. Opin.* 8 (1984) 80.
- [9] D.J. Greenblatt, M. Divoll, D.R. Abernethy et al., *Benzodiazepine pharmacokinetics: An overview*, Elsevier Science Publishers, New York, 1984.
- [10] J.H. Woods, J.L. Katz, G. Winger, *JAMA* 23 (1988) 3476.
- [11] M.A. Schuckit, *Drug and Alcohol Abuse*. Plenum Medical Book Company, New York, 1989.
- [12] Y. Mingdi, O. Ramström, *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 2005.
- [13] B. Sellergren, *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [14] M.V. Polyakov, *Zhur. Fiz. Khim.* 2 (1931) 799.
- [15] M.V. Polyakov, P.M. Stadnik, M.V. Paryokij, I.M. Malkin, F.S. Duchina, *Zhur. Fiz. Khim.* 4 (1933) 1454.
- [16] M.V. Polyakov, L.P. Kuleshina, I.E. Niemark, *Zhur. Fiz. Khim.* 10 (1937) 100.
- [17] F.H. Dickey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 35 (1949) 227.
- [18] T. Takagishi, I.M. Klotz, *Biopolymers* 11 (1972) 483.
- [19] G. Wulff, A. Sarhan, *Angew. Chem. Int. Ed.* 11 (1972) 341.

- [20] L.I. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984).
- [21] H.F. Hawari, N.M. Samsudin, A.Y. Shakaff, S.A. Ghani, M.N. Ahmad, Y. Wahab, U. Hashim; *Sensors Actuat. B-Chem.*, 187 (2013) 434.
- [22] X. Wang, J. Luo, C. Yi, X. Liu; *Electroanal.* 25 (2013) 1907.
- [23] L. Li, Y. Liang, Y. Liu; *Anal. Biochem.* 434 (2013) 242.
- [24] J. Li, Y. Li, Y. Zhang, G. Wei; *Anal. Chem.* 84 (2012) 1888.
- [25] O. Gurtova, L- Ye, F. Chmilenko; *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 287.
- [26] A.L. Jenkins, M.W. Ellzy, L.C. Buettner; *J. Mol. Recognit.* 25 (2012) 330.
- [27] G. Vasapollo, R.D. Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 5908.
- [28] K. Takeba, K. Fujinuma, T. Miyazaki, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 205.
- [29] D.N. Heller, M.L. Smith, O.A. Chiesa, *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 91.
- [30] E. Verdon, P. Couëdor, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 108.
- [31] O. Gurtova, F. Chmilenko, L. Ye; *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 287.
- [32] M. Arvand, H.A. Samie; *Drug. Test. Anal.* 5 (2013) 461.
- [33] W.S. Cai, R.B. Gupta, *Sep. Purif. Technol.* 35 (2004) 215.
- [34] H. Dong, A.J. Tong, L.D. Li, *Spectrochim. Acta A* 59 (2003) 279.
- [35] J-F. He, Q-H. Zhu, Q-Y. Deng, *Spectrochim. Acta A* 67 (2007) 1297.
- [36] A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1742.
- [37] B. Sellergren, M. Lepisto, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 5853.
- [38] O. Ramström, I.A. Nicholls, K. Mosbach, *Tetrahedron: Asymmetry* 5 (1994) 649.
- [39] M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* 691 (1995) 317.
- [40] M.M. Titirici, B. Sellergren, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1913.
- [41] L.I. Andersson, R. Müller, G. Vlatakis, K. Mosbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 4788.

- [42] A.G. Mayes, L.I. Andersson, K. Mosbach, *Anal. Biochem.* 222 (1994) 483.
- [43] H.A. Andreetta, L. Bruzzone, *Anal. Letters* 41(2008) 36.
- [44] F. Puoci, G. Cirillo, M. Curcio, F. Iemma, U.G. Spizzirri, N. Picci, *Anal. Chim. Acta* 593 (2007) 164.
- [45] S. Scorrano, L. Longo, G. Vasapollo, *Anal. Chim. Acta* 659 (2010) 167.
- [46] J. Fan, Y. Wei, J. Wanga, Ch. Wub, H. Shi, *Anal. Chim. Acta* 639 (2009) 42.
- [47] Y. Fang, Sh. Yan, B. Ning, N. Liu, Z. Gao, F. Chao, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2323.
- [48] L. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 5211.
- [49] I.R. Dunkin, J. Lenfeld, D.C. Sherrington, *Polymer* 34 (1993) 77.
- [50] S.A. Piletsky, H. Matuschewski, U. Schedler, A. Wilpert, E.V. Piletska, T.A. Thiele, M. Ulbricht, *Macromolecules* 33 (2000) 3092.
- [51] L. Fischer, R. Müller, B. Ekberg, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 9358.
- [52] R. Suedee, C. Songkram, A. Petmoreekul, S. Sangkunakup, S. Sankasa, N. Kongyarit, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 519.
- [53] M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* 664 (1994) 276.
- [54] M. Kempe, L. Fischer, K. Mosbach, *J. Mol. Recognit.* 6 (1993) 25.
- [55] M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* 691 (1995) 317.
- [56] S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, A.V. Elgersma, K. Yano, I.Karube, Y.P. Parhometz, A.V. Elskaya, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 959.
- [57] C. Yu, O. Ramström, K. Mosbach, *Anal. Lett.* 30 (1997) 2123.
- [58] S.A. Piletsky, E.V. Piletska, K. Karim, K.W. Freebairn, C.H. Legge, A.P.F. Turner, *Macromolecules* 35 (2002) 7499.
- [59] K. Sreenivasan, *Polym. Int.* 42 (1997) 169.
- [60] K. Sreenivasan, *Talanta* 44 (1997) 1137.
- [61] K. Sreenivasan, R. Sivakumar, *J. Appl. Polym. Sci.* 66 (1997) 2539.
- [62] E. Verdon, P. Coëudor, *J. Pharm. Bio. Anal.* 14 (1996) 1201.

- [63] S.A. Piletsky, A.P.F. Turner, *Electroanal.* 14 (2002) 317.
- [64] P.J. Bushway, B.E.S. Young, L.R. Paradis, L.B. Perkins, *J. AOAC* 77 (1994) 1243.
- [65] R.V. Arenas, H. Rahman, N.A. Johnson, *J. AOAC* 79 (1996) 579.
- [66] M. Oishi, K. Onishi, I. Kano, H. Nakazawa, *J. AOAC* 77 (1994) 1293.
- [67] P. Corti, E. Dreassi, N. Politi, C. Aprea, *Food Addit. Contam.* 9 (1992) 243.
- [68] M.S. Young, D.J. Philips, P.C. Iraneta, J. Krol, *J. AOAC* 84 (2001) 556.
- [69] M.S. Young, M.F. Early, C.R. Mallet, J. Krol, *J. AOAC* 84 (2001) 1608.
- [70] D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, A.I. Mantis, *Analyst* 119 (1994) 2801.
- [71] L. Guardia, A. Fernández-González, *An. Quím.* 103 -2 (2007) 14.
- [72] W.J. Cheong, S.H. Yang, F. Ali, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 609.
- [73] L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 187.
- [74] R.C. Stringer, S. Gangopadhyay, S.A. Grant; *Anal. Chim. Acta* 703 (2011) 239.
- [75] K. Hosoya, K. Yoshizako, N. Tanaka, K. Kimata, T. Araki, J. Haginaka, *Chem. Lett.* 1994, 1437.
- [76] H. Haginaka, H. Sanbe, H. Takehira, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 117.
- [77] E. Yilmaz, K. Haupt, K. Mosbach, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 12.
- [78] M. Shamsipur, J. Fasihi, K. Ashtari, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7116.
- [79] H. Tokuyama, S. Naohara, M. Fujioka, S. Sakohara, *React. & Funct. Pol.* 68 (2008) 182.
- [80] Haginaka, J., *J. Chromatogr. B* 866 (2008) 3.
- [81] D. Wistuba, V Schurig, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 255.
- [82] H.F. Zou, X.D. Huang, M.L. Ye, Q.Z. Luo, *J. Chromatogr. A*, 5 (2002) 954.
- [83] B. Sellergren in *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, G. Subramanina (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [84] B. Sellergren, in *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid*

*Chromatography*, G. Subramanian (Ed.) Wiley-VCH, Weinheim, 1994.

[85] B. Sellergren, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1578.

[86] Z. Sun, W. Schüssler, M. Sengl, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chim. Acta* 620 (2008) 73.

[87] S. Le Moullec, A. Begos, V. Pichon, B. Bellier, *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 7.

[88] G. Theodoridis, E.H.M. Kosterb, G.J. de Jongb, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 49.

[89] S. Scorrano, L. Longo, G. Vasapollo, *Anal. Chim. Acta* 659 (2010) 167.

[90] D. Jégourel, R. Delépée, F. Breton, A. Rolland, R. Vidal, L.A. Agrofoglio, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 8932.

[91] B. Rezaei, S. Mallakpour, N. Majidi, *Talanta* 78 (2009) 418.

[92] C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 29.

[93] A. Valero-Navarro, A. Salinas-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, R. Mallavia, A. Fernández-Gutiérrez, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2305.

[94] Zhu Qiu jin, Wang Liping, Wu Shengfang, Joseph Wasswa, Gu Xiaohong, Tang Jian, *Food Chem.* 113 (2009) 608.

[95] B.B. Prasad, A. Srivastava, M.P. Tiwari, *J. Chromatogr. A* 1283 (2013) 9.

[96] L.Schweitz, L.I. Anderson, S. Nilsson, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1179.

[97] Z.S. Liu, C. Zheng, C. Yan, R.Y. Ga, *Electrophoresis* 28 (2007) 127.

[98] Y. Huang, Z. Liu, C. Zheng, R. Gao, *Electrophoresis* 30 (2009) 155.

[99] M. Lämmerhofer, A. Gargano, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 1091.

[100] J. Nilsson, P. Spegel, S. Nilsson, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 3.

[101] G. Wulff, *Chem. Rev.* 102 (2002) 1.

[102] C. Zhou, T. Wang, J. Liu, C. Guo, Y. Peng, J. Bai, M. Liu, J. Dong, B. Ning, Z. Gao, *Analyst* 137 (2012) 4469.

[103] B.B. Prasad, A. Prasad, M.P. Tiwari, R. Madhuri, *Biosens Bioelectron* 45 (2013) 114.

- [104] Z. Zhao, Y. Teng, G. Xu, T. Zhang, X. Kan, *Anal. Letters* 46 (2013) 2180.
- [105] C. Malitesta, E. Mazzotta, R. Picca, A. Poma, I. Chianella, S. Piletsky, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1827.
- [106] I. Sánchez-Barragán, K. Karim, J.M. Costa-Fernández, S.A. Piletsky, A. Sanz-Medel, *Sensor Actuat. B* 123 (2007) 798.
- [107] Y. Fanga, S. Yan, B. Ning, N. Liu, Z. Gao, F. Chao, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2323.
- [108] X. Kan, T. Liu, C. Li, H. Zhou, Z. Xing, A. Zhu, *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 3502.
- [109] L.Q. Wang, F.Y. Lin, L.P. Yu, *Analyst* 137 (2012) 3502.
- [110] L. Liu, X. Tang, X. Fang, Y. sun, F. Lei, Z. Huang, *Electroanal.* 24 (2012) 1647.
- [111] C. Li, G. Zhan, M. Ma, Z. Wang, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 90 (2012) 152.
- [112] J. Janata, A. Bezech, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 62.
- [113] C.Y. Huang, H.J. Syu, Y.S. Chuan, B.D. Liu, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1694.
- [114] A.F. Turner, G.S. Wilson, *Biosensors*, Oxford Science Publishers, Oxford, 1987.
- [115] D.L. Wisel, *Applied Biosensors*, Butterworth, Boston, MA, 1989.
- [116] L.J. Blum, P.R. Coulet, *Biosensors Principles and Applications*, Marcel Dekker, New York, 1991.
- [117] T.E. Edmonds (Ed), *Chemical Sensors*, Blackie and Son, Reino Unido, 1988.
- [118] C-G. Xie, S. Gao, H-K. Zhou, H-F. Li, *Luminiscence*, 26 (2011) 271.
- [119] H. Kim, Y. Kim, J.Y. Chang, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 50 (2012) 4990.
- [120] Z. Chen, F. Navarro-Volloslada, M.C. Moreno-Bondi, M. Álvarez-Pérez, G. Orellana, *Sensor Actuat. B-Chem.* 191 (2014) 137.
- [121] A. Álvarez, J.M. Costa, R. Pereyro, A. Sanz Medel, *Sensor Actuat. B-Chem.* 168 (2012) 370.
- [122] B. Wu, Z. Wang, Z. Xue, X. Zhou, J. Du, X. Liu, X. Lu, *Analist* 137 (2012) 3644.

- [123] F. Lu, J. Yang, M. Sun, L. Fan, H. Qiu, X. Li, C. Luo, *Anal Bioanal. Chem* 404 (2012) 79.
- [124] T.H. Nguyen, T. Sun, K.T.V. Grattan, S.A. Hardwick, *IEEE Sensors Journal* 12 (2012) 255.
- [125] M.A. Arnold, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1015.
- [126] M.E. Collison, M.E. Meyerhoff, *Anal. Chem.* 62 (1990) 425.
- [127] D.C. Carter, J.X. Ho, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 153-203.
- [128] N. Barbero, E. Barni, C. Barolo, P. Quagliotto, G. Viscardi, L. Napione, S. Pavan, F. Bussolino, *Dyes Pigments* 80 (2009) 307.
- [129] J. Schaller, S.G. Gerber, U. Kämpfer, S. Lejon, C. Trachsel, *Human Blood Plasma Proteins: Structure and function*. Wiley, New York, 2008.
- [130] X.M. He, D.C. Carter, *Nature* 358 (1992) 209.
- [131] S. Hamdani, D. Joly, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi, *J. Mol. Struct.* 936 (2009) 80.
- [132] D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill, 2000.
- [133] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill, 2001.
- [134] S.V. Konev, *Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids*. Plenum Press, New York, 1967.
- [135] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> ed. Springer Publisher, New York, 2006.
- [136] H. Cao, D. Wu, H.Wang, M. Xu, *Spectrochim. Acta A* 73 (2009) 972.
- [137] S. Bi, Y. Sun, Ch. Qiao, H. Zhang, Ch. Liu, *J. Lumin.* 129 (2009) 541.
- [138] T.G. Dewey, *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, 1991.
- [139] M.M. Yang, X.L. Xi, P. Yang, *Chin. J. Chem.* 24 (2006) 642.
- [140] V. Anbazhagan, R. Renganathan, *J. Lumin.* 128 (2008) 1454.
- [141] D.A. Leckband, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29 (2000) 1.
- [142] P.D. Ross, S. Subramanian, *Biochemistry* 20 (1981) 3096.
- [143] S.N. Timasheff, *Thermodynamic of protein interactions*, in: H. Peeters (Ed.), *Proteins of Biological Fluids*, Pergamon Press, Oxford, 1972.

- [144] T. Förster, *Modern Quantum Chemistry*. Academic Press, New York, 1965.
- [145] L. Cyril, J.K. Earl, W.M. Sperry, *Biochemist's Handbook*, E. & F.N. Spon, London, 1961.
- [146] B. Valeur, J.C. Brochon, *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*. Springer Press, Berlin, 2001.
- [147] S. Deepa, A.K. Mishra, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 556.
- [148] F. Cui, Y. Yan, Q. Zhang, X. Yao, G. Qu, Y. Lu, *Spectrochim. Acta A* 74 (2009) 964.
- [149] J. Xiao, X. Wei, Y. Wang, C. Liu, *Spectrochim. Acta A* 74 (2009) 977.
- [150] X. Pan, R. Liu, P. Qin, L. Wang, X. Zhao, *J. Lumin.* 130 (2010) 611.
- [151] N. Wang, L. Ye, F. Yan, R. Xu, *Int. J. Pharm.* 351 (2008) 55.
- [152] J. Barret, W. Franklin Smith, I.E. Davidson, *J. Pharm. Pharmac.* 285 (1973) 387-393.
- [153] H. Schutz, *Benzodiazepines*, Springer, New York, 1982.
- [154] A.M. Gil Tejedor, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 112-115.
- [155] J. Dolejšová, P. Solich, Ch.K. Polydorou, M.A. Koupparis, C.E. Efstathiou, *J. Pharm. Biom. Anal.* 20 (1999) 357-362.
- [156] D. Gambart, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 93-102.
- [157] H. Ishii, K. Satoh, *Anal. Chem.* 312 (1982) 114.
- [158] D.D. Manes, G.J. Yakatan, *J. of Pharm. Sci.* 64 (1975) 651-654.
- [159] B. Claude, P. Morin, S. Bayouhd, J. de Ceaurriz, *J. Chromatog. A* 1196-1197 (2008) 81.
- [160] J. Fan, Y. Wei, J. Wang, Ch. Wu, H. Shi, *Anal. Chim. Acta* 639 (2009) 42.
- [161] E. Yilmaz, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Commun.* 36 (1999) 167.
- [162] M. Ariffin, E. Miller, P.A.G. Cormack, R.A. Anderson, *Anal Chem* 79 (2007) 256.
- [163] S. Scorrano, L. Longo, G. VAsapallo, *Anal. Chim. Acta* 659 (2010) 167.



- [164] M. Yang, W. Gu, L. Sun, F. Zhang, Y. Ling, X. Chu, D. Wang, *talanta* 81 (2010) 156.
- [165] J.N. Miller, J.C. Miller, *Estadística para Química Analítica segunda edición*, Addison- Wesley iberoamericana, USA, 1993.
- [166] M. H. Kutner *et. al.*, *Applied Linear Statistical Models*, 5ª ed., McGraw Hill, Singapore, 2005.
- [167] M.A. Castillo, R.C. Castells, *J. Chromatogr. A* 921 (2001) 121.
- [168] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.C.M. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbooks of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [169] IUPAC prepared by L:A: currie, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1699.
- [170] S. Morante Zarcero, *Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica*, Dickinson, Madrid, 2007.
- [171] W. Horwitz, *J. AOAC* 65 (1982) 525.
- [172] R.C. Castells, M.A. Castillo, *Anal. Chim. Acta*, 423 (2000) 179.
- [173] M.J. Cardone, *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* 66 (1983) 1283.
- [174] M.A. Castillo, L. Bruzzone, *Anal. Sciences*, 22 (2006) 431.
- [175] M.A. Castillo, L. Ongaro Gambino, G. Polizzi, H.A. Andreetta, L. Bruzzone, *Luminescence* 22 (2007) 527.