

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS
FACULTAD DE QUIMICA, BIOQUIMICA Y FARMACIA



“DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS
MODERNAS DESTINADAS A LA DETERMINACIÓN DE
SUSTANCIAS PROHIBIDAS Y/O RESTRINGIDAS, PARA EL
CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS COSMÉTICOS”

Tesis presentada por la Farm. Vicario, Ana Laura
Para optar por el grado de Doctora en Farmacia

Directora: Dra. Gómez, María Roxana
Co-director: Dr. Bertolino, Franco

2018

El presente trabajo de Tesis dio origen a las siguientes comunicaciones:

Publicaciones:

- “**A simple and highly selective molecular imprinting polymer-based methodology for propylparaben monitoring in personal care products and industrial waste waters**”. Ana Vicario, Leslie Aragón, Chien C. Wang, Franco Bertolino, María R. Gómez.
Publicado en *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Elsevier). Vol.149 (2018) 225-233.

- “**Molecular imprinting on surface of silica particles for the selective extraction of benzylparaben in flow system applied to cosmetics and water samples**”. Ana Vicario, Manuel Solari, Emiliano Felici, Leslie Aragón, Franco Bertolino, María R. Gómez.
Publicado en *Microchemical Journal* (Elsevier). Vol. 142 (2018) 329-334.

Presentaciones a Congresos Internacionales:

- Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas RICiFa. Participación en carácter de colaborador del trabajo titulado: **Síntesis de adsorbente selectivo mips-aunps-silica para la preconcentración de ivermectina en agua**. Organizado por: Comité Organizador UNSL-UNC-UNR (Noviembre 2018, San Luis).

- Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas RICiFa. Participación en carácter de autor y expositor del trabajo titulado: **Solid phase extraction with molecularly imprinted polymers for selective determination of propylparaben in personal care products**. Organizado por: Comité Organizador UNC-UNR (Octubre 2016, Córdoba). AAPS PharmSciTech (ISSN 1530-9932).

- Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas RICiFa. Participación en carácter de autor y expositor del trabajo titulado: **Electrochemical determination**

of methylparaben in baby wipes. Organizado por: Comité Organizador UNC-UNR (Septiembre 2014, Córdoba).

Presentaciones a Congresos Nacionales:

- IX Congreso Argentino de Química Analítica. Participación en carácter de autor y expositor del trabajo titulado: **Modificación de la superficie de partículas de sílica gel mediante imprinting molecular para la extracción selectiva de parabenos en productos cosméticos.** Organizado por: Asociación Argentina de Químicos Analíticos (Noviembre 2017, Rio Cuarto).
- Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas COIFFA. Participación en carácter de autor y expositor del trabajo titulado: **Desarrollo de polímeros de impresión molecular para la determinación selectiva de parabenos en productos cosméticos.** Organizado por: Comité Organizador UNC (Noviembre 2015, Córdoba).

ÍNDICE

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN

1.1.Productos para el cuidado personal.....	1
1.1.1. Antecedentes	1
1.1.2. Cosméticos y cosmecéuticos.....	1
1.1.3. Normas regulatorias en la composición.....	3
1.1.4. Composición.....	5
1.1.4.1. Parabenos.....	5
1.1.4.1.1. Propiedades y clasificación.....	5
1.1.4.1.2. Aplicaciones. Productos cosméticos. Normas regulatorias.....	7
1.1.4.1.3. Exposición y toxicología.....	8
1.1.4.1.4. Contaminación ambiental.....	10
1.1.5. Aspectos metodológicos de la determinación de sustancias prohibidas en PCPs.....	12
1.1.5.1. Etapas generales de un proceso analítico.....	12
1.1.5.2. Determinación de sustancias prohibidas y/o restringidas.....	14
1.1.6. Métodos espectroscópicos.....	17
1.1.6.1. Espectroscopia de absorción molecular.....	18
1.1.6.2. Espectrofotometría UV-Visible.....	19
1.1.6.3. Espectroscopia de absorción para IR.....	19
1.1.7. Técnicas electroquímicas.....	21
1.1.7.1. Celdas electroquímicas	22
1.1.7.2. Técnicas voltamperométricas modernas. Voltamperometría cíclica.....	24
1.1.7.3. Técnicas de barrido de potencial por pulsos. Voltamperometría de onda cuadrada.....	28
1.1.8. Técnicas cromatográficas.....	32
1.1.8.1. Clasificación de los métodos cromatográficos.....	33

1.1.8.2. HPLC.....	35
1.1.8.2.1. Cromatografía en fase reversa.....	37
1.2.Impresión molecular.....	38
1.2.1. Generalidades.....	38
1.2.2. El proceso químico de impresión molecular.....	40
1.2.2.1. Elección de la molécula molde (templado-plantilla).....	40
1.2.2.2. Generación de la huella molecular: Modelos empleados en la síntesis.....	41
1.2.2.3. Proceso de polimerización.....	43
1.2.2.4. Extracción de la molécula molde.....	43
1.2.3. Parámetros a evaluar en el desarrollo de MIPs.....	44
1.2.3.1. Monómero funcional.....	45
1.2.3.2. Entrecruzante.....	46
1.2.3.3. Porógeno.....	47
1.2.3.4. Iniciador.....	48
1.2.4. Diferentes formatos de MIPs.....	49
1.2.4.1. Polimerización en bloque.....	49
1.2.4.2. Polimerización por precipitación	50
1.2.4.3. Polimerización por suspensión	51
1.2.4.4. Polimerización por hinchamiento en etapas.....	52
1.2.4.5. Partículas esféricas recubiertas.....	52
1.2.4.6. Polimerización en láminas delgadas.....	53
1.2.5. Técnicas de caracterización	54
1.2.5.1. Caracterización química.....	54
1.2.5.1.1. Microanálisis elemental.....	55
1.2.5.1.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	55
1.2.5.1.3. RMN en estado sólido.....	56
1.2.5.2. Caracterización Morfológica	56
1.2.5.2.1. Experimentos de absorción de solventes.....	56
1.2.5.2.2. Porosimetría de sorción de nitrógeno.....	57
1.2.5.2.3. Porosimetría de intrusión de mercurio.....	57

1.2.5.2.4. Cromatografía Inversa de Exclusión de tamaño (ISEC).....	57
1.2.5.2.5. Microscopía electrónica de barrido.....	58
1.2.6. Aplicaciones.....	58
1.2.6.1. Pretratamiento de muestra y separación cromatográfica.....	59
1.2.6.1.1. Extracción en fase sólida (MISPE).....	59
1.2.6.1.2. Separaciones cromatográficas.....	62
1.2.6.2. En sistemas de detección.....	63
1.2.6.3. Detección electroquímica.....	63
1.2.6.4. Dispensadores de medicamentos.....	65
1.2.6.5. En procesos catalíticos.....	66
1.3.Nanomateriales.....	67
1.3.1. Nanopartículas Metálicas: Oro.....	68
1.3.2. Técnicas de Caracterización.....	73
1.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido.....	73
1.3.2.2. Energía dispersiva de rayos X.....	74
1.3.2.3. Difracción de rayos X.....	74

Capítulo 2

REACTIVOS, MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y Soluciones.....	92
2.1.1. Metilparabeno, Propilparabeno y Bencilparabeno.....	92
2.1.2. Butilparabeno.....	92
2.1.3. Ácido Benzoico.....	93
2.1.4. Reactivos de síntesis para MISPE y MIS.....	93
2.1.5. Síntesis de nanopartículas de oro.....	93
2.1.6. Cartuchos para SPE.....	94
2.1.7. Solventes empleados para HPLC.....	94
2.1.8. Soluciones reguladoras de pH.....	94
2.2. Equipamiento utilizado.....	96
2.2.1. HPLC y UHPLC.....	96
2.2.2. Estación de trabajo electroquímico.....	96

2.2.2.1.	Electrodos.....	96
2.2.3.	Espectrofotómetro.....	97
2.2.4.	Análisis por inyección en flujo.....	97
2.2.5.	Espectroscopia IR.....	97
2.2.6.	Área BET (Brunauer -Emmett-Teller).....	98
2.2.7.	Microscopía electrónica de barrido.....	98
2.2.8.	pH-metro.....	98
2.2.9.	Centrífuga.....	98
2.2.10.	Vortex.....	98
2.2.11.	Shaker.....	99
2.2.12.	Balanza.....	99
2.3.	Procedimientos.....	100
2.3.1.	Síntesis de MIPs para la monitorización de propilparabeno en productos de cuidado personal y efluentes.....	100
2.3.1.1.	Síntesis del polímero.....	100
2.3.1.2.	Preparación de la muestra.....	101
2.3.1.3.	Ensayos de interacción MIP-PP.....	101
2.3.1.4.	Ensayos de elución.....	103
2.3.1.5.	Análisis de muestras por HPLC-DAD.....	103
2.3.1.6.	Validación.....	104
2.3.2.	Modificación de partículas de silica para la extracción de Bencilparabeno. Automatización de muestreo.....	106
2.3.2.1.	Preparación de las partículas de sílice impresas (Si-MIP).....	106
2.3.2.2.	Descripción de las muestras y tratamiento.....	107
2.3.2.3.	Evaluación de unión y desorción en <i>batch</i>	107
2.3.2.4.	Estudios de extracción en fase sólida (SPE) automatizada. Pre concentración.....	108
2.3.2.5.	Validación.....	109
2.3.3.	Síntesis de MIS sobre un electrodo de carbono vítreo modificado con nanopartículas de oro electrodepositadas para la determinación de Butilparabeno.....	111

2.3.3.1.	Preparación del electrodo.....	111
2.3.3.1.1.	Pretratamiento del electrodo de trabajo.....	111
2.3.3.1.2.	Electrodepositión de nanoparticulas de oro.....	111
2.3.3.1.3.	Preparación de la película de siloxano con impresión molecular (MIS).....	112
2.3.3.1.4.	Experimentos de unión.....	114
2.3.3.2.	Preparación de la muestra.....	114
2.3.3.3.	Medidas electroquímicas.....	114
 Capítulo 3		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
3.1.	Desarrollo de una metodología utilizando polímeros de impresión molecular para la monitorización de propilparabeno en productos de cuidado personal y efluentes.....	116
3.1.1.	Síntesis del polímero.....	118
3.1.2.	Caracterización morfológica del polímero.....	119
3.1.3.	Estudio de optimización en <i>batch</i>	122
3.1.4.	Selección del Solvente de Interacción.....	124
3.1.5.	Evaluación de la especificidad de las cavidades del polímero.....	126
3.1.6.	Optimización de la cantidad de polímero y tiempo de interacción.....	127
3.1.7.	Influencia del pH de la muestra en la interacción MIP-PP.....	129
3.1.8.	Evaluación de los parámetros de preconcentración.....	130
3.1.9.	Selección de solvente y volumen de elución.....	132
3.1.10.	Validación.....	134
3.1.11.	Utilización del polímero en extracción en fase sólida (MISPE): aplicación a una muestra real.....	138
3.1.12.	Conclusión.....	141
3.2.	Impresión molecular en superficie de partículas de sílica gel para la extracción selectiva de benzilparabeno en protectores solares y muestras de agua aplicando un sistema en flujo.....	145
3.2.1.	Síntesis del polímero y caracterización.....	147

3.2.2. Evaluación del reconocimiento específico de los polímeros impresos, no impresos y de las partículas de sílica recubiertas (MIP, NIP, Si-MIP y Si-NIP).....	149
3.2.3. Parámetros de preconcentración.....	157
3.2.4. Validación.....	159
3.2.5. Conclusión.....	164
3.3.Determinación selectiva de butilparabeno en PCPs utilizando un sensor electroquímico modificado mediante la deposición de una película de siloxano con impresión molecular (MIS).....	166
3.3.1. Preparación y modificación del electrodo de trabajo.....	167
3.3.2. Comportamiento electroquímico de BuP en el sensor impreso.....	168
3.3.3. Optimización de las condiciones analíticas para la determinación de BuP.....	170
3.3.3.1. Influencia del tiempo de incubación.....	170
3.3.3.2. Influencia del solvente de incubación.....	170
3.3.3.3. Influencia de los diferentes medios de medida.....	172
3.3.3.4. Parámetros analíticos.....	173
3.3.4. Aplicación del sensor GC/AuNPs-MIS en muestras reales.....	175
3.3.5. Estudio de interferencias.....	177
3.3.6. Conclusión.....	178
Capítulo 4	
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	183

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Productos para el cuidado personal

1.1.1. Antecedentes

Millones de personas utilizan diariamente cosméticos o productos de cuidado personal (PCP). Estos productos se utilizan sobre la piel y mucosas, y aunque es poco probable que sus componentes la penetren y se produzca una exposición sistémica significativa no puede excluirse totalmente esta posibilidad.

Si bien los PCP se utilizan con el objeto de higienizar, perfumar, proteger o mantener en buen estado diversas partes del cuerpo, [1] hay diversas sustancias naturales y sintéticas que se incorporan a los PCP y pueden producir efectos locales, dentro de los que se pueden mencionar, irritación, sensibilización y fotorreacciones [2,3]. Esto es de importancia principalmente para el caso de compuestos que quedan de forma permanente en la piel, como son ciertos componentes de desodorantes, toallas húmedas y tinturas para el cabello. Dada la significativa y relativamente incontrolada exposición a los PCP, la seguridad de estos productos debe ser evaluada a fondo antes de su comercialización.

1.1.2. Cosméticos y Cosmecéuticos

La Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FD&C Act) de los EE. UU. define los cosméticos como “artículos destinados a ser frotados, vertidos, salpicados, rociados, introducidos o aplicados de otro modo en el cuerpo humano o partes del mismo para limpiar, embellecer, fomentar la atracción, o alterar la apariencia”[4]. En forma similar la Administración Nacional de Medicamentos y Tecnología Médica (ANMAT) de la República Argentina, define a los productos cosméticos como “preparaciones constituidas por sustancias naturales o sintéticas o sus mezclas, de uso externo en las diversas partes del

cuerpo humano: piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes y membranas mucosas de la cavidad oral, con el objeto exclusivo o principal de higienizarlas, perfumarlas, cambiarles su apariencia, protegerlos o mantenerlos en buen estado y/o corregir olores corporales. Estos productos no podrán proclamar actividad terapéutica”[5].

Desde una perspectiva global, la definición legal de cosméticos/PCPs aún no es clara, en este punto se puede mencionar a los protectores solares, la Unión Europea (UE), los considera como productos cosméticos, mientras que en los EE.UU., son medicamentos de venta libre; otro claro ejemplo son las tinturas para el cabello, en la UE son cosméticos, pero son cuasi-fármacos en Japón, y están sujetos a las regulaciones de drogas con requerimientos de seguridad similares a los medicamentos [6].

Un producto puede ser un medicamento, un cosmético o ambos. La FD&C Act define las drogas como aquellos productos que curan, tratan, mitigan o previenen enfermedades o que afectan la estructura o función del cuerpo humano, si un producto cumple con estas afirmaciones, será regulado como un medicamento. Los cosméticos están destinados a embellecer, promover el atractivo, alterar la apariencia o limpiar; no están destinados a afectar la estructura o función del cuerpo.

Hace algunos años la Sociedad Norteamericana de Químicos Cosméticos acuñó el término “cosmecéutico” para referirse a productos híbridos entre medicamentos y cosméticos [7]. Si bien la FD&C Act no reconoce el término “cosmecéutico”, la industria cosmética utiliza esta palabra para referirse a los productos cosméticos que tienen beneficios medicinales o similares a los medicamentos.

Actualmente el término “cosmecéutico” no tiene una categoría regulatoria, sin embargo algunos PCP requieren especial atención por parte de los entes reguladores debido a su complejidad científica o al mayor riesgo potencial para la salud de los consumidores. Las diferencias en los marcos regulatorios pueden ser particularmente importantes para los llamados “productos frontera”, difíciles de clasificar en una categoría específica [8]. Mientras que los cosméticos convencionales son productos de publicidad y venta masiva, haciendo el propio usuario la elección, los cosmecéuticos requieren un canal especializado en el que un prescriptor diseña y controla de forma personalizada el tratamiento.

Los cosmecéuticos encuentran múltiples aplicaciones dermatológicas para combatir los signos del envejecimiento cutáneo, arrugas y líneas de expresión, manchas, lesiones del fotoenvejecimiento o el enrojecimiento facial. También se emplean cosmecéuticos en patologías como el acné y vitílico. Particularmente para el acné se utilizan maquillajes que contienen ácido glicólico y salicílico, siendo un claro ejemplo de “productos frontera”, ya que son comercializados como cosméticos por más que contengan un principio activo, no habiendo restricción alguna en su venta y uso. Asimismo, debe considerarse que las personas que padecen estos trastornos, además hacen uso de agentes cosméticos (maquillajes, autobronceantes, etc.) que, sin contener principios activos, ayudan con la carga psicosocial de la enfermedad. Sin embargo, estos productos pueden agravar el cuadro clínico original a causa de ciertos componentes habituales de los mismos.

1.1.3. Normas Regulatorias en la composición

En Europa, la Directiva 76/768/EEC determina las sustancias prohibidas en la composición de los productos cosméticos (anexo II) y la lista de sustancias que son objeto de restricciones

o de condiciones específicas de utilización (anexo III) (Figura 1.1). La Directiva también establece la lista de colorantes (anexo IV), conservantes (anexo VI) y filtros UV (anexo VII) autorizados.

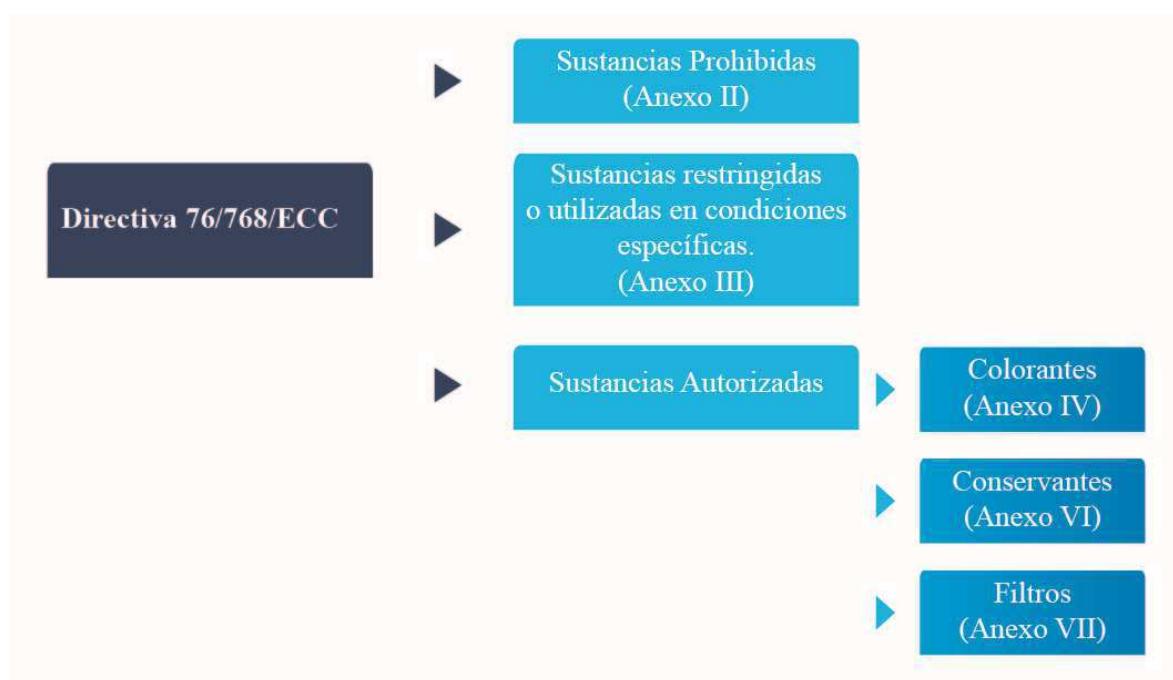


Figura 1.1. Sustancias reguladas por la Directiva 76/768/EEC de la Comisión de la Unión Europea

En la República Argentina rigen las Resoluciones Mercosur según lo dispuesto por ANMAT [9–11]. Dentro de las sustancias prohibidas, compuestos farmacológicamente activos que no pueden añadirse a un producto cosmético, podemos mencionar algunos ejemplos como anestésicos, antihistamínicos, antimicóticos, corticosteroides, hormonas, diuréticos, antihipertensivos y drogas usadas para la disfunción eréctil masculina [12, 13]. En productos de aplicación post-solar y en lociones para la caída del cabello se han encontrado anestésicos y antihistamínicos añadidos ilegalmente [14, 15].

Entre las sustancias autorizadas, se encuentran los parabenos (PAs), utilizados como conservantes para prevenir la aparición de hongos y microorganismos en alimentos, bebidas, productos farmacéuticos y cosméticos. Los más utilizados son metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP), butilparabeno (BuP) y bencilparabeno (BeP). Estos compuestos se encuentran en casi todos los tipos de cosméticos y como tienen efectos sinérgicos a menudo se encuentran dos o más asociados [16]. Si bien estos productos se encuentran incluidos en la lista de sustancias autorizadas, se establece para los mismos una concentración máxima límite.

1.1.4. Composición

1.1.4.1. Parabenos

1.1.4.1.1. Propiedades y Clasificación

En términos de estructura química, los PAs son ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, con sustituyentes alquilo que van desde grupos metilo hasta butilo o bencilo Figura 1.2 [17]. Como se mencionó anteriormente, se pueden distinguir MP, EP, PP, isopropilparabeno (iPP), BuP, isobutilparabeno (iBuP) y BeP. Entre ellos, el MP y el PP son los más empleados y suelen ser utilizados en combinación en muchos tipos de fórmulas químicas [18]. Las principales propiedades fisicoquímicas de los PAs se muestran en la tabla 1.1. Comercialmente, los parabenos se producen por esterificación de ácido p-hidroxibenzoico con un alcohol apropiado en presencia de un catalizador (por ejemplo, ácido sulfúrico concentrado o ácido p-toluenosulfónico) [19].

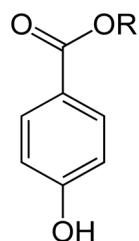


Figura 1.2. Estructura química general de un parabeno: *para*-hidroxibenzoato de *R*, donde *R* es un grupo alquilo.

Características	MP	EP	PP	BuP	BeP
Fórmula Química	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Peso Molecular (g/mol)	152.16	166.18	180.21	194.23	228.25
pKa	8.17	8.22	8.35	8.37	-
Coeficiente de partición octanol-agua (log Kos)	1.66	2.19	2.71	3.24	3.56
Solubilidad en agua 25°C (g.100 ml.)	2.00	0.86	0.30	0.15	0.05

Tabla 1.1. Características físicas y químicas de los parabenos.

Mientras que en soluciones acuosas ácidas, los parabenos son estables, en soluciones alcalinas, se hidrolizan en ácido p-hidroxibenzoico y el alcohol correspondiente. En general, con el aumento en la longitud de la cadena de alquilo, la resistencia a la hidrólisis aumenta [20]. Las propiedades antibacterianas de PAs son directamente proporcionales a la longitud de la cadena del grupo éster, por lo que, el BuP tiene una capacidad 4 veces mayor para inhibir el crecimiento microbiano que el EP. Sin embargo, simultáneamente con el aumento de la longitud de la cadena de alquilo, aumenta el valor del coeficiente de partición octanol-agua, lo que da como resultado una disminución de la solubilidad en agua. El cloro reacciona con parabenos para producir derivados clorados [21]. Se ha observado que incluso unos pocos minutos de contacto entre los cosméticos que contienen PAs y el agua del grifo clorada dan como resultado la formación de subproductos clorados y bromados. Este fenómeno es alarmante debido a la alta estabilidad de los derivados di-clorados resultantes y su elevado

potencial estrogénico [21,22]. Las numerosas propiedades que predisponen a los parabenos para su uso como conservantes han contribuido a su considerable popularidad. Las características que determinan la utilidad de PB incluyen, entre otros [23–27]:

- Amplio espectro de actividad contra levaduras, mohos y bacterias.
- Estabilidad química (para un amplio intervalo de temperatura y pH que incluye el intervalo 4,5 - 7,5).
- Inercia.
- Bajo grado de toxicidad sistémica.
- Buena solubilidad en agua.
- Bajos costos de producción.
- Sin olor o sabor perceptible.
- No causa cambios en la consistencia o coloración de los productos.

La combinación de estas propiedades hace que sea relativamente difícil encontrar un conservante, que reemplace satisfactoriamente a los parabenos.

1.1.4.1.2. Aplicaciones. Productos cosméticos. Normas Regulatorias

Los parabenos se introdujeron en el año 1920 como conservantes en productos farmacéuticos [28]. Actualmente, son conservantes ampliamente utilizados, principalmente en cosméticos y productos farmacéuticos, pero también en productos alimenticios y productos industriales.

Los parabenos están presentes en aproximadamente el 80% de los productos de cuidado personal [29]. En un estudio de 1995, se encontraron parabenos en el 77% de los PCPs y en el 99% de los cosméticos que permanecen en contacto con la piel [25].

La ANMAT al igual que la UE permite el uso de PAs en una concentración máxima total de 0,8% (p/p) [30], mientras que deben ser utilizados individualmente en una concentración máxima de 0,4% (p/p). Las unidades gubernamentales de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) y Canadá (Health Canada) han recomendado el mismo umbral para PAs. Sin embargo, no existe una legislación que regule las concentraciones de parabenos en cosméticos en ninguno de esos países [31]. La concentración total máxima de PAs permitida en Japón es igual a 1.0% [20]. En 2011, el gobierno danés decidió introducir restricciones adicionales, prohibiendo el uso de algunos parabenos (PP, iPP, BuP e iBuP) en PCPs destinados a niños menores de 3 años [32].

El Comité Científico de Seguridad de los Consumidores de la Comisión Europea en el año 2014, modificó los valores de PP y BP que consideraba seguros para el consumidor en PCPs. A partir de Abril de 2015 la suma de sus concentraciones individuales no debe exceder 0,14% (p/p) habiendo estado permitido hasta esa fecha un 0,19% (p/p), además se prohibió la presencia de esta combinación de conservantes en PCPs destinados a niños menores de 3 años [33, 34].

En el cambio de milenio, se publicaron varios estudios que sugieren actividad estrogénica de los PAs [35] y potencial carcinogénico [36]. Como resultado, algunos fabricantes alteraron la composición de sus productos cosméticos al reemplazar los parabenos con otros sistemas conservantes y al introducir en el mercado las denominadas fórmulas "libres de parabenos".

1.1.4.1.3. Exposición y Toxicología

Las personas habitualmente utilizan PCPs que pueden contener en su composición PAs. Se estima que un adulto utiliza aproximadamente 17,76g de PCPs diarios y un niño

aproximadamente 0,38g [2]. A partir de esa información, suponiendo que se utilizan PAs en la concentración más alta permisible (0,8%), la dosis diaria de parabenos totales se ha estimado en 142,08 y 3,02 mg para adultos y niños, respectivamente. Un 66% de los PAs que ingresan al organismo son aportados por PCPs; asimismo, recientemente Liao et al. (2013) detectaron seis tipos de parabenos en varios alimentos adquiridos en el mercado Chino. Del total de las muestras analizadas, en el 99% de los casos se encontraron parabenos y las concentraciones totales alcanzaron hasta 2530 ng.g⁻¹. Sin embargo, en comparación con la exposición a PAs originados en PCPs, el valor de la ingesta diaria estimada de parabenos de alimentos fue bajo.

Las principales fuentes de exposición humana a los parabenos son PCPs y productos farmacéuticos. El nivel de exposición se refleja por la detección frecuente de los compuestos en la orina. Al menos uno de los PAs se encontró en casi el 100% de las muestras de orina analizadas. Además, los conservantes se detectaron en suero humano, leche, tejido placentario y en tejido tumoral mamario. Muchas sustancias químicas presentes en nuestro entorno, incluidos los PAs poseen actividad estrogénica y su presencia es preocupante ya que pueden alterar la función hormonal en humanos, lo que conduce a problemas en la reproducción y susceptibilidad a contraer algún tipo de cáncer [37–39]. Se ha demostrado que los PAs producen trastornos reproductivos en modelos animales [40–42] y, potencialmente, podrían ocasionar trastornos en el sistema reproductivo masculino de seres humanos [39]. Debido a que se han detectado parabenos intactos en tumores de mama humanos [43] es posible que su actividad estrogénica pueda desempeñar un papel en el desarrollo de tumores de mama sensibles a estrógenos [44]. En células de cáncer de mama humano, la reducción gradual del tamaño del componente alquilo del grupo éster en

parabenos da como resultado una reducción paralela en su actividad estrogénica, ya sea por disminución en la longitud de la cadena lineal de alquilo [45], por la pérdida de ramificación en la cadena alquílica [46] o por la eliminación del anillo aromático en BeP [45].

Algunos estudios en animales han demostrado que los PAs se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal [47–50], y también pueden ser absorbidos a través de la piel [51, 52]. Se ha demostrado que la piel humana posee isoformas de carboxilesterasa [53] y se ha sugerido que esta actividad enzimática daría como resultado la hidrólisis de ésteres de parabenos aplicados por vía dérmica al ácido p-hidroxibenzoico en la piel [54]. Además, estudios recientes indican que el ácido p-hidroxibenzoico en sí mismo posee su propia actividad estrogénica intrínseca. Se ha predicho actividad de unión al receptor de estrógenos para el ácido p-hidroxibenzoico [55] y otros estudios informan que posee actividad estrogénica en ensayos uterotróficos de roedores inmaduros [56].

1.1.4.1.4. Contaminación ambiental

El uso generalizado de parabenos ha resultado en su omnipresencia en el ambiente. Las principales fuentes de contaminación son las plantas de tratamiento de aguas residuales. Aunque el porcentaje de remoción de PAs en la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) es alto (en promedio 96.1-99.9%), los contaminantes aún están presentes en los efluentes (en concentraciones de hasta aproximadamente 4000 ng/L), lo que da como resultado su fuga al medio ambiente. Los PAs se detectaron en recursos hídricos, suelo y sedimentos, aire y polvo, así como en la biota. En general, entre todos los parabenos medidos, los más frecuentemente encontrados fueron MP y PB siendo estas las especies más comúnmente utilizadas en cosméticos.

La concentración y la aparición de los contaminantes depende en gran medida de la estación.

Las concentraciones máximas de PAs medidas se correlacionaron con épocas de sequía [57].

Durante temporadas de bajo flujo, las cargas de los compuestos liberados se disuelven en un volumen de agua menor, lo que da como resultado un aumento de sus concentraciones [17].

Debe tenerse en cuenta la variabilidad estacional al estimar el impacto de los PCPs en el medio ambiente. Teniendo en cuenta las condiciones locales, como así también la cercanía de cursos de agua, la probabilidad de encontrar PAs en época turística es mayor, ya que aumenta la afluencia de personas y el consumo de PCPs, como protectores solares y lociones humectantes.

La solubilidad de los compuestos y los valores del coeficiente de partición octanol-agua que determina la afinidad por la materia orgánica indican que la posibilidad de acumulación de parabenos en los sedimentos aumenta proporcionalmente con la longitud de cadena del sustituyente alquilo. Algunos resultados indican que las concentraciones de PAs y sus derivados clorados son varias veces mayores en la fase sólida suspendida en el agua del río en comparación con la fase disuelta [27].

Núñez et al. (2008) analizaron PAs en suelos forestales y agrícolas y sedimentos de diferentes áreas de España. Las concentraciones más altas en la mayoría de las muestras se registraron para MP y PP. Los valores registrados fueron de hasta 6,35; 5,10; 4,03; 0,45 y 0,71 ng.g⁻¹ de peso seco para MP, EP, PP, BeP y BuP, respectivamente. Vale la pena mencionar que, en general, las concentraciones más altas se detectaron en los sedimentos [18]. Esto puede deberse al hecho de que los sedimentos contienen típicamente una gran cantidad de fracción orgánica y pueden tener un contacto continuo con los contaminantes disueltos en solución acuosa, lo que conduce a la deposición de parabenos.

1.1.5. Aspectos metodológicos de la determinación de sustancias prohibidas en PCPs

Como se mencionó anteriormente, las leyes que regulan los cosméticos son diversas en diferentes partes del mundo, y las sustancias que los componen están sujetas a varios niveles de regulación, existiendo así sustancias químicas prohibidas, y otras que deben cumplir con determinados criterios regulatorios para ser utilizadas como ingredientes en cosméticos y PCPs.

Por otro lado, se insta a las empresas de cosméticos a garantizar que los productos comercializados y sus ingredientes sean seguros bajo condiciones razonables de uso, de acuerdo con la legislación vigente. Por lo tanto, la gran cantidad de sustancias a controlar, la amplia gama de estructuras químicas y la variedad de matrices complejas que las contienen, representan un gran desafío para el desarrollo de metodologías analíticas confiables.

1.1.5.1. Etapas generales de un proceso analítico

El proceso analítico se define como el conjunto de operaciones previas realizadas sobre la muestra, el proceso de medida y la adquisición de datos. El número de pasos o etapas que componen el proceso analítico dependerá principalmente de cinco factores:



- Problema analítico.
- Tipo de muestra.
- Analitos a investigar.
- Herramientas disponibles.
- Metodología de medidas.

Las **operaciones previas** de preparación de muestra tienen como objetivo adecuarla para la medición propiamente dicha, son el nexo de unión entre la muestra y la segunda etapa del proceso analítico. En esta instancia el operador tiene una gran participación y suele ser difícil de automatizar, y de acoplar en línea a la segunda etapa.

Figura 1.3. Etapas de un proceso analítico

En un procedimiento analítico aproximadamente entre el 70 al 90% del tiempo es consumido por las operaciones previas, además existe la posibilidad de que ocurran importantísimos errores tanto accidentales como sistemáticos, afectando la calidad de los resultados. Una inadecuada toma de muestra, una mala disolución, conservación, separación incompleta de interferentes, etc., podrían llevar a errores de gran magnitud, mayores a los que generalmente se producen en las otras etapas.

Por lo tanto, las operaciones previas serán un punto crítico y el rendimiento de las mismas tendrá un impacto crucial en el resultado final, incidiendo directamente sobre la exactitud, selectividad, sensibilidad, precisión y rapidez del proceso [58].

Los procedimientos más usados para el tratamiento de las muestras son la, evaporación, centrifugación, precipitación, extracción líquido-líquido, extracción líquido-sólido, filtración, extracción en fase sólida y liofilización.

La segunda etapa del proceso analítico, corresponde a la **medida y transducción de la señal analítica**, donde se utiliza un instrumento de medida.

Las señales medidas pueden ser de una naturaleza muy diversa: óptica, electroquímica, másica, térmica, magnética, entre otras. Habitualmente esta señal primaria se amplifica y traduce a una señal eléctrica, que es lo que finalmente se mide. Un procesador expresa esa señal eléctrica en unidades relacionadas con la medición que se realiza (absorbancia en fotometría, intensidad de fluorescencia, entre otras.)

Finalmente la **adquisición de señales y tratamiento de datos** representa la tercera etapa del procedimiento, etapa que requerirá del uso de herramientas como la estadística y herramientas computacionales, e indudablemente requerirá de la interpretación de los resultados y de la experticia del analista.

1.1.5.2. Determinación de sustancias prohibidas y/o restringidas

El permanente avance de los métodos de análisis utilizando técnicas separativas se ha visto acompañado en paralelo con el perfeccionamiento de estrategias para la preparación de muestras. Estas metodologías tienen el objeto de extraer el o los analitos de interés de

matrices complejas. El desarrollo de nuevas tecnologías en este campo ha permitido aumentar la especificidad de la extracción que luego se traduce en un incremento en la selectividad y sensibilidad cromatográfica.

La determinación de sustancias prohibidas y/o restringidas en PCPs se ha llevado a cabo utilizando varias técnicas tales como HPLC, mediante el uso de detectores tales como: UV [59], electroquímicos [60], espectrometría de masa [61], con diferentes ventajas y desventajas. Por un lado, los métodos que emplean sistemas de detección electroquímicos y de masa presentan alta sensibilidad y selectividad en comparación con los sistemas de detección ópticos, no obstante estos métodos requieren una instrumentación sofisticada. Independiente de cual sea el sistema de detección, para el caso de muestras complejas como son los PCPs se requieren métodos de pretratamiento de muestra que permitan la extracción de analitos diana sin la interferencia de otros componentes presentes en la muestra.

Parámetros de calidad como son la selectividad y sensibilidad, se ponen a prueba a la hora de analizar sustancias prohibidas y/o restringidas en matrices complejas. La IUPAC, define la selectividad como “la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar” [62] . Por lo tanto, y para que sea una herramienta útil para el químico analítico, los valores de selectividad deberían indicar hasta qué punto la concentración de un analito predicha por el método puede estar afectada por otros interferentes presentes en la muestra. Los interferentes pueden distorsionar la señal del analito de interés, evitando su identificación.

La sensibilidad de un método analítico se define de acuerdo a la IUPAC como la pendiente de la curva de calibración, tratándose de una característica del método que depende sólo del proceso de medida. Así definida, la sensibilidad no es otra cosa que el factor de respuesta, o lo que es lo mismo, el cociente entre la variación de señal asociada a un determinado analito y la variación de su concentración o cantidad.

El químico analítico dispone de diferentes opciones para conseguir una mayor selectividad y/o selectividad, para el primer caso se utilizan diferentes técnicas que consisten en la eliminación directa de los interferentes, mediante la optimización de las condiciones experimentales y/o instrumentales, por otra parte, la sensibilidad de un método se puede mejorar realizando una preconcentración del analito en estudio.

En el presente trabajo de tesis se propone la síntesis de MIPs con la finalidad de aumentar tanto la sensibilidad como la selectividad. El MIP se utilizó como sorbente para la extracción en fase sólida (SPE), esta metodología nos permite retener específicamente analitos diana para luego preconcentrarlos y analizarlos sin la presencia de interferentes.

1.1.6. Métodos espectroscópicos

Los métodos espectroscópicos de análisis se basan en la medición de la radiación electromagnética emitida o absorbida por los analitos. Los **métodos de emisión** utilizan la radiación emitida cuando un analito es excitado por energía térmica, eléctrica o energía radiante. Los **métodos de fluorescencia** también se basan en la radiación emitida por el analito. En la fluorescencia, sin embargo, la radiación emitida se genera por exposición de la muestra a un haz de radiación electromagnética proveniente de una lámpara. Por el contrario, los **métodos de absorción** se basan en la disminución de la potencia (o atenuación) de un haz de radiación electromagnética como consecuencia de su interacción con el analito.

Los métodos espectroscópicos también se clasifican de acuerdo con la región del espectro electromagnético que se utiliza. Estas regiones incluyen los rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas y radiofrecuencias. Históricamente, los primeros métodos espectroscópicos se restringieron al uso de la radiación visible; por esta razón se denominan **métodos ópticos**. Sin embargo, debido a que los instrumentos empleados en estos métodos tienen alguna similitud, esta terminología se ha ampliado a los métodos que utilizan la radiación ultravioleta e infrarroja a pesar de que el ojo humano no percibe ninguno de estos tipos de radiación.

Este texto se enfocará principalmente a los métodos ópticos basados en la radiación ultravioleta y visible, y también se hará referencia a los métodos de espectroscopía infrarroja ya que fueron los métodos utilizados en el presente trabajo de tesis.

1.1.6.1. Espectroscopia de absorción molecular

Toda molécula es capaz de absorber radiación electromagnética a ciertas longitudes de onda características. En este proceso, la energía de la radiación es transferida temporalmente a la molécula y, como consecuencia, disminuye la intensidad de la radiación. Cuando se produce la absorción se dice que la radiación está atenuada.

La figura 1.4 ilustra la atenuación de un haz colimado de radiación monocromática, antes y después de haber atravesado una capa de solución con un grosor de b cm y una concentración c de una especie absorbente. A causa de la interacción entre los fotones y las especies absorbentes, la potencia del haz disminuye de P_0 hasta P . La transmitancia T de la solución se define como la fracción de radiación incidente transmitida por la solución:

$$T = P / P_0$$

La absorbancia de una solución se define por la ecuación:

$$A = -\log_{10} T = \log \left(\frac{P_0}{P} \right)$$

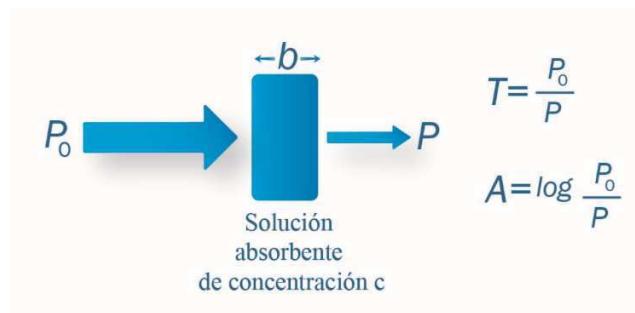


Figura 1.4. Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente.

De acuerdo con la ley de Lambert y Beer, la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente (c) y con la longitud de la trayectoria (b) de la radiación en el medio absorbente. Es decir,

$$A = \log \left(\frac{P_0}{P} \right) = abc$$

donde a es una constante de proporcionalidad denominada absorvidad. Cuando la concentración c se expresa en moles por litro, y b en centímetros, la constante de proporcionalidad se denomina absorvidad molar y se la representa con el símbolo ε

$$A = \varepsilon bc$$

1.1.6.2. Espectrofotometría UV-Visible

Las aplicaciones cualitativas de espectrofotometría ultravioleta/visible son limitadas porque el espectro de la mayoría de los compuestos en solución consiste en uno o, unos pocos picos amplios sin estructura fina que podrían ser requeridos para su identificación precisa. En contraste, este método es uno de los más utilizados para el análisis cuantitativo. Entre las características importantes de espectrometría cuantitativa ultravioleta/visible están la amplia aplicabilidad en sistemas orgánicos, inorgánicos y bioquímicos; buena sensibilidad con límites de detección de 10^{-4} a 10^{-7} M; selectividad moderada; exactitud y precisión razonables (errores relativos en el intervalo de 1% a 3%); rapidez y bajo costo. Además, los métodos espectrofotométricos son fácilmente automatizados.

1.1.6.3. Espectroscopia de absorción para IR

La espectroscopia infrarroja se ha empleado para análisis tanto cualitativos como cuantitativos. Sus aplicaciones cualitativas asumen mayor importancia siendo una de las

herramientas más poderosas e importantes de las que dispone el analista para la identificación y determinación de la estructura de especies orgánicas, inorgánicas y bioquímicas. Todas las especies moleculares absorben radiación infrarroja con la excepción de un conjunto de especies homonucleares, como hidrógeno molecular, oxígeno y nitrógeno. Además, el espectro de compuestos relativamente simples proporciona numerosos máximos y mínimos que son útiles con fines de identificación. Más aún, el espectro infrarrojo en el intervalo de 2,5 a 15 μm de un compuesto proporciona una huella dactilar única, la cual es distingüible fácilmente de los patrones de absorción de todos los otros compuestos; sólo los isómeros ópticos tienen espectros idénticos.

Por otro lado, las aplicaciones cuantitativas de la espectroscopía infrarroja son mucho más limitadas que para el caso de la espectroscopía ultravioleta/visible debido a las absorbividades molares bajas, al hecho de que las señales de los espectros infrarrojos presentan la característica de ser muy finas y a las dificultades instrumentales para medir transmitancia con exactitud.

1.1.7. Técnicas Electroquímicas

La aplicación de los distintos métodos electroquímicos requiere un entendimiento de los principios fundamentales de las reacciones de electrodo y de las propiedades eléctricas de la interfase electrodo/solución. En cuanto a las fases a través de las cuales ocurre el transporte de carga, casi siempre una de ellas es un electrolito, a través del cual la carga es transportada por el movimiento de iones. Pueden ser soluciones líquidas, sales fundidas o sólidos iónicos conductores. La otra fase es un electrodo, donde el transporte de carga y, por lo tanto, la corriente eléctrica, se realiza exclusivamente por el movimiento de electrones libres, en respuesta al campo eléctrico al que están expuestos. Los electrodos pueden ser metales o semiconductores, sólidos o líquidos. Los iones no pueden atravesar el metal ni los electrones viajar a través de la solución, tal como se describe en la figura 1.5.

Dada esta situación y ya que la acumulación de carga no puede ocurrir indefinidamente en la interfase electrodo/solución, se produce la transferencia electrónica desde y hacia la superficie de ambos electrodos [63]. En el electrodo cargado negativamente (-) los electrones son transferidos desde el metal a las moléculas cercanas a la interfase, dando lugar a la formación de más especies negativas. Inversamente, las moléculas en la superficie del electrodo cargado positivamente (+) liberan electrones sobre el metal, transformándose en especies con carga más positiva.

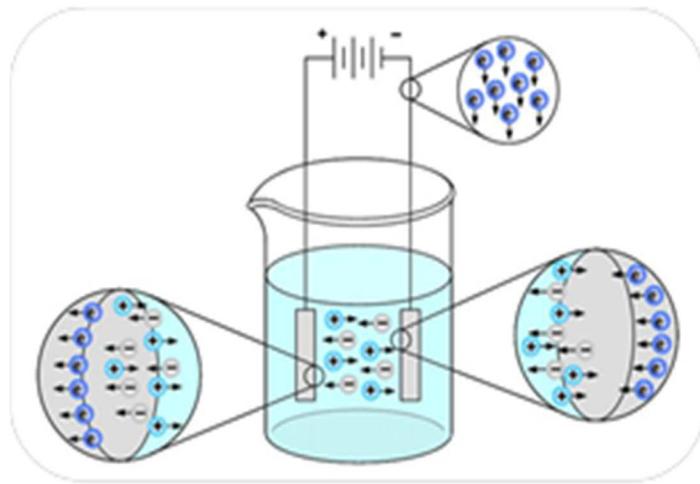


Figura 1.5. Movimiento de cargas en un sistema electroquímico.

En todo proceso electroquímico, siempre están involucrados los dos electrodos. Si bien la naturaleza química de la reacción que ocurre sobre uno de los electrodos puede ser completamente diferente e independiente de la que ocurre en el otro, siempre un proceso es de oxidación y el otro de reducción. Generalmente interesan los eventos que pueden ocurrir en una sola de las interfaces electrodo/solución. Sin embargo, es imposible estudiar experimentalmente una interfase aislada; lo que deben analizarse son las propiedades de un conjunto de interfaces que constituyen las llamadas celdas electroquímicas. Estos sistemas son definidos generalmente como dos electrodos separados por una fase de electrolito

1.1.7.1. Celdas Electroquímica

Están compuestas por:

- El **electrodo de trabajo** (WE, por sus siglas en inglés) suele ser una superficie metálica, poli o monocrystalina o un semiconductor donde se producen las reacciones de oxidación/reducción. Estos electrodos pueden ser "activos" ya que se disuelven o se forman

a medida que se produce la reacción en la celda o "inertes". Posee en uno de sus extremos un disco perfectamente pulido de varios materiales de electrodo (carbono vítreo, oro, platino, paladio, níquel, o plata). El diámetro del disco puede ser de 1,6 mm ó 3,0 mm, dependiendo del material de elección.

- El **contraelectrodo** (CE), es un alambre de Pt de 0.5 mm de diámetro y de longitud variable. El alambre de Pt es conectado a un terminal de bronce por medio de un conector de oro. Si en el WE tiene lugar una oxidación, los electrones liberados tienen que ser consumidos por otros reactivos en el CE teniendo lugar una reducción y al revés. Por tanto los electrones van por el circuito exterior desde el electrodo de trabajo (oxidación) al contraelectrodo (reducción) mientras que en la disolución la corriente es transportada por los iones del electrolito soporte. El área del contraelectrodo tiene que ser mayor que la del electrodo de trabajo para evitar polarizaciones.
- El **electrodo de referencia** (ER) nos sirve para saber la diferencia de potencial de la interfase WE/disolución de forma relativa, ya que si cambia el ER cambia el potencial, debido a que no se puede determinar el valor absoluto de la diferencia de potencial de una interfase metal/disolución. El ER es una interfase no polarizable y la intensidad que pasa por él es del orden de 10^{-9} A para que su potencial permanezca constante. La contribución IR puede ser minimizada reduciendo R introduciendo un electrolito soporte de alta conductividad y disminuyendo la distancia entre el ER y WE. Como electrodo de referencia se utiliza un electrodo de Ag/AgCl 3 mol L⁻¹ NaCl.

1.1.7.2. Técnicas voltamperométricas modernas. Voltamperometría cíclica

Las técnicas voltamperométricas involucran la medición de corriente que fluye a través de un electrodo al que se le aplica un potencial conocido. En química se usa la voltamperometría con dos propósitos: para estudiar la naturaleza de las reacciones electroquímicas, y para medir la concentración de especies químicas en solución. Cualquiera sea el propósito de la medición, dos factores limitan la calidad de la información. Uno es la sensibilidad de la medición, es decir, la pendiente k de la curva de calibración corriente vs. concentración del material que origina la corriente. El otro factor es la corriente de fondo, que no está relacionada con el material de interés químico ni con la oxidación o reducción de impurezas presentes en las soluciones. Esta corriente se origina porque la interfase electrodo/solución se comporta de manera similar a un capacitor electrónico. Cuando se aplica una diferencia de potencial a un capacitor, las cargas se acumulan en sus placas metálicas hasta alcanzar su máxima capacidad de carga. La carga de un capacitor consiste en la acumulación de electrones en una placa y la deficiencia de electrones en la otra. Durante el proceso de carga, fluye a través del circuito una corriente denominada corriente de carga o capacitiva. En un electrodo, aunque las cargas capacitivas no atraviesan la interfase electrodo/solución, puede circular una corriente externa transitoria cuando se aplica un potencial, cuando se cambia el potencial aplicado, el área del electrodo o la composición de la solución.

De todos los métodos disponibles para el estudio de los procesos de electrodo, los de barrido de potencial y entre ellos la voltamperometría cíclica (VC), son probablemente los más usados. En ellos el potencial impuesto al electrodo de trabajo varía continuamente según una función conocida en el tiempo. Esto provoca las reacciones de oxidación ó reducción de las

especies electroactivas en solución (reacciones faradaicas), posiblemente la adsorción de especies de acuerdo al potencial, y una corriente capacitiva debido al cargado de la doble capa. Se registra la relación corriente-potencial, lo que es equivalente a analizar la corriente en función del tiempo.

El potencial se varía linealmente en el tiempo en sentido anódico o catódico hasta un valor predeterminado y luego se cambia la dirección de barrido hasta alcanzar el potencial inicial u otro potencial (Fig. 1.6). El potencial en el cual cambia el signo de la pendiente se denomina potencial de cambio y es un importante parámetro a tener en cuenta en esta técnica. Cuando el potencial vuelve a su valor de partida, concluye un ciclo y se puede comenzar otro análogo.

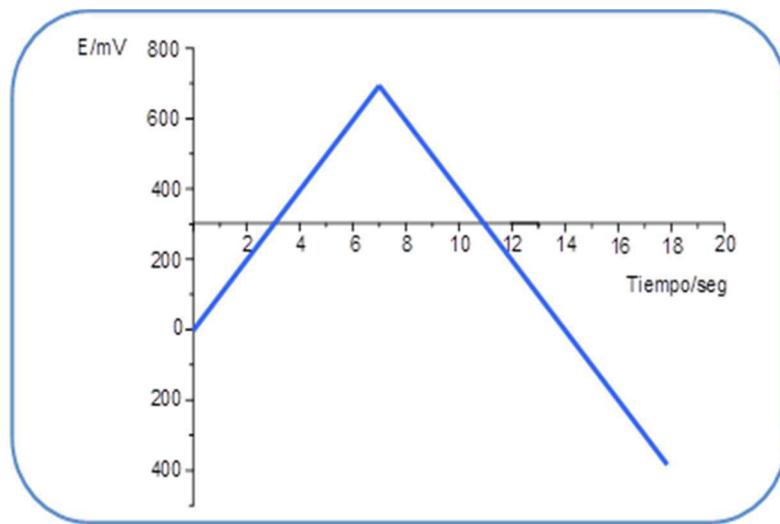


Figura 1.6. Forma de la onda de potencial para voltamperometría cíclica

Tanto el potencial inicial como el de cambio se pueden elegir a voluntad de acuerdo al análisis que se quiera realizar. Fundamentalmente, el potencial inicial se debe seleccionar de modo de evitar reacciones indeseables previas al ensayo. El intervalo de potenciales seleccionado para una experiencia es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controlada por difusión de uno o más analitos. Dependiendo de la composición de la muestra,

la dirección del barrido inicial puede ser negativo (barrido catódico) o positivo (barrido anódico). La variación del potencial aplicado al electrodo de trabajo en función del tiempo respecto del electrodo de referencia, es la señal de excitación con la cual el sistema electroquímico responde, produciendo una reacción de intercambio de electrones en el electrodo de trabajo, que genera una corriente eléctrica. La corriente medida depende de dos etapas: el movimiento del material electroactivo hacia la superficie del electrodo y de la reacción de transferencia de electrones. Es necesario el agregado de un electrolito soporte a los efectos de eliminar la migración iónica, además como se trabaja en soluciones en reposo, no existe el transporte por convección, y el transporte de la sustancia se realiza mediante la difusión.

Las curvas corriente vs. potencial en VC se denominan voltamperogramas cíclicos, y la forma de las mismas depende de si el sistema electroquímico analizado es reversible o irreversible. En la figura 1.7 se muestra la variación de la intensidad de corriente cuando una disolución 1 mmol L⁻¹ de hidroquinona en solución reguladora de fosfato 0,01 mol L⁻¹ es sometida a una señal de excitación cíclica.

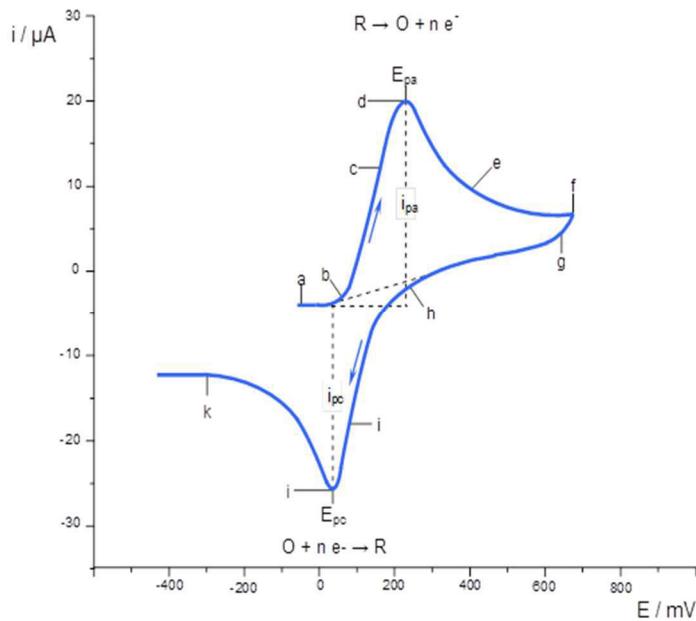


Figura 1.7. Voltamperograma cíclico de una disolución 1 mmol L^{-1} de hidroquinona en solución reguladora de fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 7,20$), $v=100 \text{ mV s}^{-1}$.

Los parámetros importantes que se pueden distinguir en un voltamperograma cíclico son el potencial del pico catódico (E_{pc}), el potencial del pico anódico (E_{pa}), corriente de pico catódico (i_{pc}) y corriente de pico anódico (i_{pa}) (Fig. 1.7).

La VC no es una técnica utilizada en el análisis cuantitativo, sino que es una importante herramienta para el estudio de los mecanismos y de las velocidades de procesos de oxidación-reducción, en particular, para sistemas orgánicos y de metales con compuestos orgánicos y para el estudio de los distintos fenómenos de adsorción y modificaciones en general en las superficies de electrodos. A menudo, la VC es el primer experimento que se realiza en el estudio de un compuesto o superficie de un electrodo, dado la capacidad para observar rápidamente el comportamiento redox en un amplio intervalo de potenciales. Generalmente, los voltamperogramas cíclicos revelan la presencia de compuestos intermedios en las reacciones de oxidación/reducción. Además, las formas de algunos voltamperogramas

cíclicos pueden verse alteradas por la existencia de reacciones químicas acopladas que ocurren antes o después del proceso electroquímico. Así, mediante estudios realizados con esta técnica se puede obtener información acerca de los mecanismos de reacciones del sistema de interés. A menudo los voltamperogramas cíclicos revelan la presencia de intermediarios en las reacciones de oxidación y reducción.

1.1.7.3. Técnicas de barrido de potencial por pulsos. Voltamperometría de onda cuadrada

Este tipo de técnicas difiere de las anteriores porque, en este caso, se le impone al electrodo de trabajo una variación de potencial que no varía con el tiempo en forma lineal, sino que lo hace en forma de pulsos. Todas las técnicas de pulso se fundamentan sobre la base de la diferencia en la velocidad de disminución de las corrientes faradaica y de condensador, pero aquí esa diferencia es originada por la aplicación del pulso de potencial. Por lo general, en estas técnicas, el potencial es llevado abruptamente desde un valor (E_1) a otro (E_2). Después de que el potencial ha sido mantenido en el último valor durante un tiempo, es cambiado nuevamente a otro valor (por lo general al original). El ciclo completo $E_1-E_2-E_1$ constituye un pulso de potencial. Durante el tiempo que permanece aplicado el potencial E_2 , la corriente de carga decae exponencialmente con el tiempo, mientras que la corriente faradaica lo hace como una función de $1/t^{1/2}$. Para ilustrar el comportamiento de las corrientes del condensador y faradaica al aplicar un pulso de voltaje, supongamos que a un electrodo se le aplica un tren de pulsos de potencial como el representado gráficamente en la figura 1.8 a. Durante la aplicación de cada pulso se pueden generar dos corrientes: una de carga debido a la formación de la doble capa de cargas en la interfase electrodo-solución, i_c , y otra faradaica, i_f , originada por la oxidación o reducción de la sustancia en solución. La corriente de carga de la doble

capa comienza a decaer después de la aplicación del pulso en una forma similar a como lo haría en un capacitor electrónico (Fig. 1.8 b), alcanzando un valor mínimo cerca del final del pulso (si la duración del pulso es grande, es decir mayor que 200 ms, la corriente capacitiva puede alcanzar el valor 0). La corriente faradaica, mientras tanto, aumenta inicialmente hasta casi el valor de la corriente límite y, luego, decae durante el tiempo de vida del pulso. La corriente faradaica decae a una velocidad menor que la corriente capacitiva (Fig. 1.8 c) y, por consiguiente, si se mide la corriente cerca del final de cada pulso, la corriente resultante será debida principalmente al proceso faradaico.

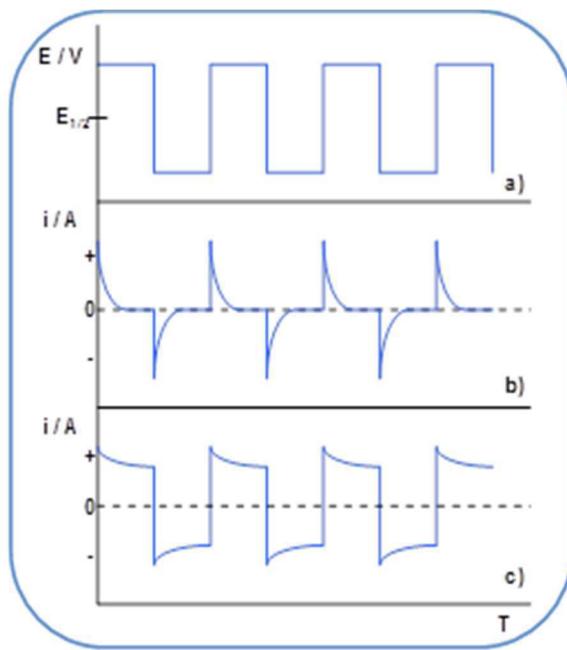


Figura 1.8. (a) Voltaje vs. Tiempo. (b) Curva de caída de corriente del condensador vs. tiempo. (c) Curva de caída de corriente faradaica vs. tiempo.

Sobre la base de este principio se han desarrollado una serie de técnicas voltamperométricas en las que el potencial se aplica al electrodo en forma de pulsos. Entre estas técnicas se encuentran:

- Voltamperometría de pulso normal (VPN).
- Voltamperometría de pulso diferencial (VPD).
- Voltamperometría de onda cuadrada de Osteryoung (VOCO).
- Voltamperometría de onda cuadrada de Barker (VOCB).

Voltametría de onda cuadrada

La técnica voltamperométrica de onda cuadrada está relacionada con las voltamperometrías de pulso y con las voltamperometrías de corriente alterna. Son similares a la VPD en el sentido de que la respuesta de la corriente al estímulo del potencial de trabajo es una curva en forma de onda o de pico y también por la efectividad en la discriminación de la corriente capacitiva. Si bien existen varios tipos de voltamperometrías de onda cuadrada, las más frecuentemente usadas son las de Osteryoung y la de Barker. La denominación de estas técnicas deriva del nombre de los investigadores que las desarrollaron. En ambas técnicas, como el nombre lo sugiere, el potencial aplicado al electrodo es de corriente alterna, y la forma de variación del potencial con el tiempo no es sinusoidal sino rectangular (o cuadrada).

En las VOC se denomina corriente directa a la corriente medida al final del pulso directo, es decir, al pulso de potencial aplicado en el mismo sentido (signo) que la variación de potencial en forma de escalera. Por lo contrario, la corriente inversa es la corriente medida, en el mismo ciclo, en el pulso inferior. Un aspecto interesante de esta técnica es que la corriente directa (forward) y la inversa (reverse) pueden ser examinadas independientemente una de la otra.

En la figura 1.9 a se muestra la forma de la curva corriente-potencial para la diferencia de corrientes, y en la figura 1.9 b las curvas corriente-potencial para cada una de las corrientes directa e inversa.

Para un sistema reversible, la corriente inversa puede ser grande, así que la diferencia de corriente es mucho mayor que las corrientes individuales, directa o inversa. Por esta razón la VOCO es más sensible que la VPD. También la magnitud de la corriente inversa puede ser utilizada para investigar la reversibilidad del proceso de transferencia de electrones. Otra ventaja de la VOCO sobre otras técnicas voltamperométricas es su velocidad. En la VOCO la velocidad está dada por el producto entre la frecuencia de la onda cuadrada y el incremento de potencial (escalón o step). Existe además una diferencia de sensibilidades de ambas técnicas, puesto que la sensibilidad aumenta, aún para procesos irreversibles, al aumentar la velocidad de barido de potencial. La mayor sensibilidad y velocidad de la VOCO han aumentado últimamente la popularidad de esta técnica para la determinación cuantitativa de especies electroactivas en solución. Actualmente, hay gran disponibilidad y relativamente bajo costo en instrumentos electroquímicos comerciales para la medida de onda cuadrada y, en consecuencia, parece probable que esta técnica alcance un uso considerable en análisis de especies orgánicas e inorgánicas.

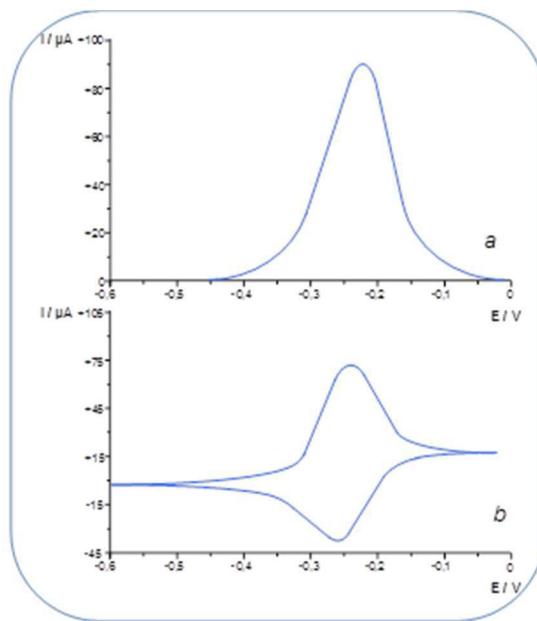


Figura 1.9. a) Curva de corriente vs. potencial en VOCO. Para la VOCB las curvas de respuesta de corriente tienen la misma forma. b) Curvas de corriente directa (superior) e inversa (inferior) vs. potencial para la VOCO.

1.1.8. Técnicas Cromatográficas

La IUPAC define a la cromatografía como “un método usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra fluye. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o empaquetada en una columna. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa” [64].

La separación de las moléculas se logra porque la movilidad de cada soluto depende de un equilibrio de distribución que se establece entre la fase móvil y la estacionaria, y esta

separación se puede realizar en función de sus cargas, masas, tamaños moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, etc.

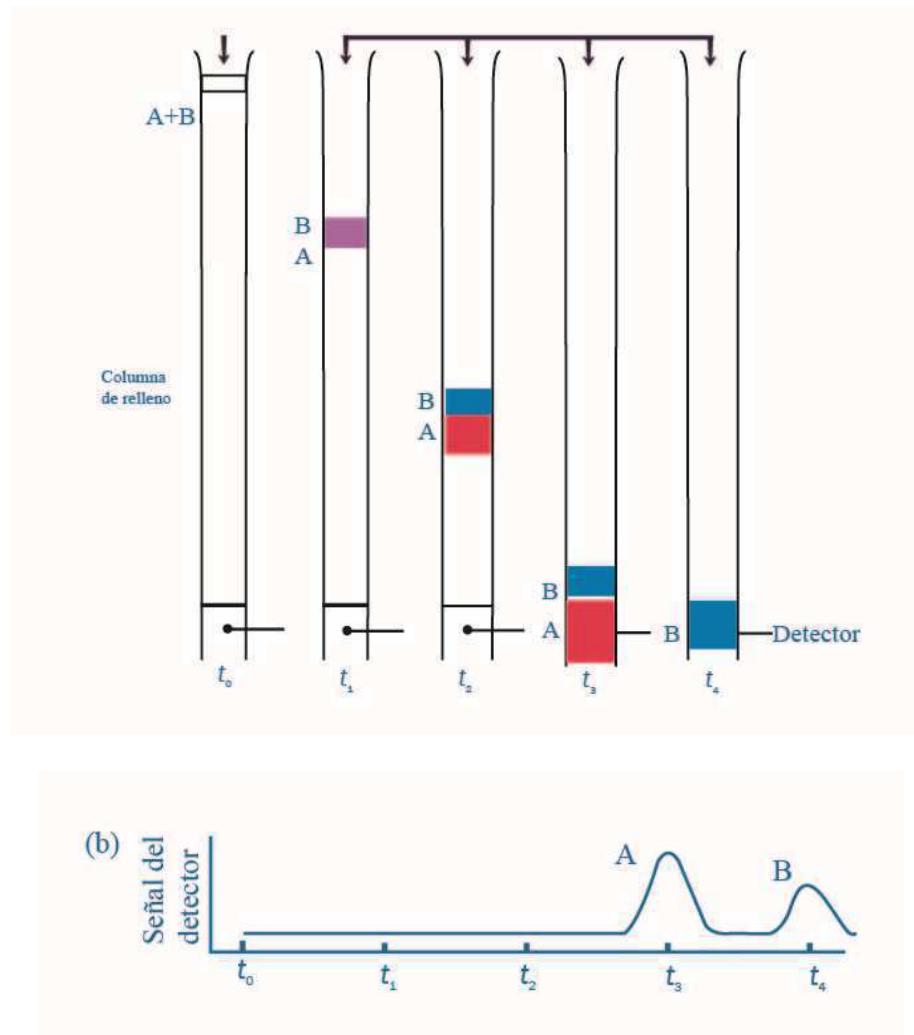


Figura 1.10. Representación esquemática de la separación de dos analitos en un sistema cromatográfico.

1.1.8.1. Clasificación de los métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos son de dos tipos. En la **cromatografía en columna** la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo angosto y la fase móvil es forzada a pasar a través

del tubo bajo presión o por gravedad. En la **cromatografía planar**, la fase estacionaria se sostiene sobre una placa plana o en los poros de un papel. En este caso, la fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por acción capilar o bajo la influencia de la gravedad.

A continuación, haremos referencia a la cromatografía en columna, más específicamente HPLC (en fase reversa) ya que fue utilizada en el desarrollo de las técnicas de análisis del presente trabajo de tesis.

Como se muestra en la primera columna de la tabla 1.2, los métodos cromatográficos se clasifican en tres categorías basadas en la naturaleza de la fase móvil, cromatografía de Gases (CG), cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) y cromatografía de líquidos (CL). La segunda columna revela que hay cinco tipos de cromatografía líquida y tres tipos de CG que difieren en la naturaleza de la fase estacionaria y los tipos de equilibrio dentro de las fases.

En la CG la fase móvil es un gas permanente (también denominado gas transportador) y la separación está fundamentalmente influenciada por la presión de vapor de los componentes de la mezcla. La CFS es similar a la CG y a la CL, pero utiliza dióxido de carbono como fase móvil para lograr un flujo de elevada presión. En el caso de la CL la fase móvil es un líquido y la muestra debe ser soluble en un solvente miscible con la fase móvil. Dentro de esta cromatografía tenemos:

- Cromatografía en capa fina (TLC)
- Cromatografía líquida en columna abierta (LLC)
- Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Clasificación General	Método Específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía líquida (CL.) (fase móvil: líquida)	Líquido-líquido o partición	Líquido adsorbido sobre un sólido	Partición entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida	Especies orgánicas unidas a una superficie sólida	Partición entre líquido y superficie unida
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio de iones	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en intersticios de un sólido polimérico	Partición/tamizado
	Gas líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Partición entre gas y líquido
Cromatografía gaseosa (CG) (fase móvil: gas)	Gas-fase unida	Especies orgánicas unidas a una superficie sólida	Partición entre líquido y superficie unida
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía fluida supercrítica (CFS) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas unidas a una superficie unida	Partición entre fluido supercrítico y superficie unida

Tabla 1.2. Clasificación de métodos cromatográficos en columna.

1.1.8.2. HPLC

La cromatografía líquida de alta performance o **CLAR** (cromatografía líquida de alta resolución, en español) puede considerarse como una forma evolucionada de la LC clásica. La principal causa de tal evolución reside en el modo que están constituidas las columnas, “corazón” de cualquier sistema cromatográfico.

En la LC, las columnas generalmente de vidrio, son grandes y están llenas con partículas de gran diámetro, hecho que se traduce en volúmenes interparticulares (volumen muerto) elevados y separaciones muy poco eficientes. La simple fuerza de gravedad es la que hace fluir la fase móvil a través de la columna.

En el caso de la cromatografía HPLC, se modifica el punto vital: se disminuye el tamaño de partícula para reducir así el volumen interparticular y conseguir una muy alta

eficiencia resolutiva. Sin embargo, al reducir drásticamente el tamaño de partícula (70-40 mm a 3-10 mm) es necesario que el instrumental soporte las elevadas presiones que se generan al hacer fluir la fase móvil a través de la columna. Un esquema de las distintas partes instrumentales que constituyen en equipo de HPLC es el siguiente:

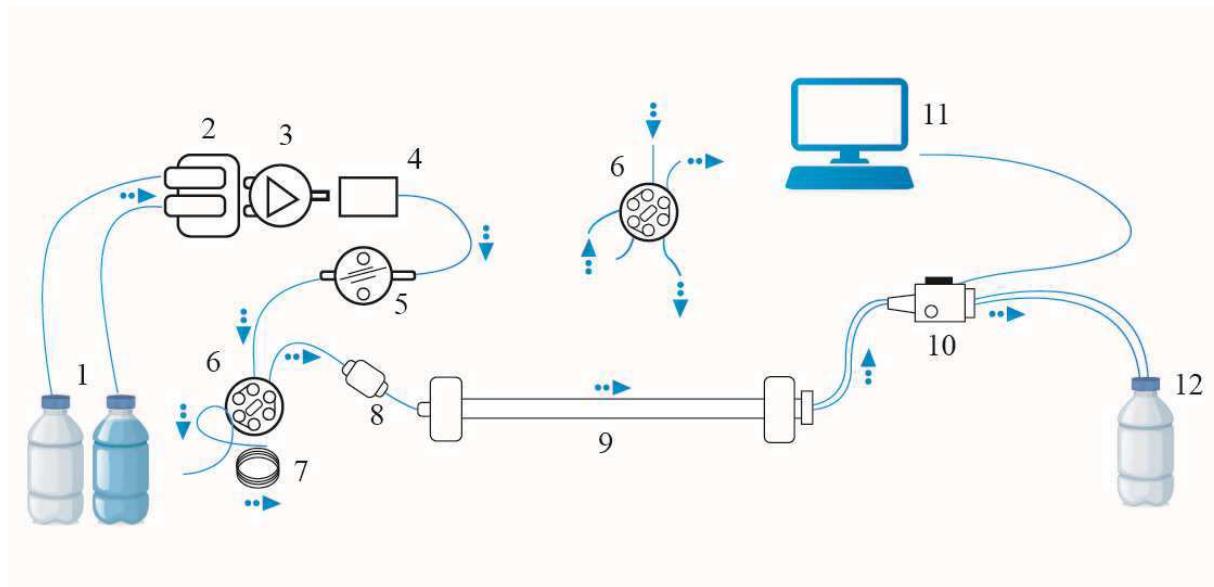


Figura 1.11. Representación esquemática de un HPLC. (1) Reservorio de solventes, (2) Sistema de desgase, (3) Válvula de gradiente, (4) Sistema de mezclado, (5) Bomba de alta presión, (6) Válvula de inyección en “modo de inyección”, (6') Válvula de inyección en “modo de carga”, (7) Bucle de muestra, (8) Precolumna, (9) Columna, (10) Detector, (11) Sistema de adquisición de datos, (12) Desagüe

1.1.8.2.1. Cromatografía en fase reversa

La cromatografía en fase reversa (RP del inglés reverse phase) en la cual la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, se distingue por:

- Fase estacionaria: Principalmente se utiliza colas alquílicas de octadecilio (C18) y en menor medida octilo (C8). Los silanoles libres que deforman el pico cromatográfico suelen ser bloqueados en un proceso de end capping.
- Fase móvil: Se utiliza en general un solvente polar (agua o solución buffer) y un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, isopropanol). El pH de la fase móvil también es un parámetro que debe ser ajustado en caso de que el o los analitos posean grupos ionizables.
- Mecanismo de retención: Considerando que el material de relleno de la columna es no polar se supone que las fuerzas de interacción entre el analito y la fase estacionaria que predominan serían de tipo hidrofóbicas y que la fuerza de retención se debe al aumento de la entropía debido a la transferencia del analito desde la fase móvil hasta la estacionaria. El analito es forzado a penetrar en la fase estacionaria debido a que la interacción entre las moléculas del analito y solvente es más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí. Así los analitos con una mayor área hidrofóbica y menor área hidrofílica serán más fuertemente retenidos por la fase estacionaria.

1.2. Impresión molecular

1.2.1. Generalidades

Existen en la naturaleza muchos casos de sistemas de reconocimiento molecular capaces de distinguir una molécula de otra. Podemos mencionar ejemplos involucrados en importantes procesos biológicos, como la unión ligando-receptor, unión antígeno-anticuerpo, y enzima-sustrato, además de los procesos de reconocimiento involucrados en la activación de genes. A pesar de la selectividad de los sistemas analíticos basados en estrategias de reconocimiento de moléculas aplicando sistemas biológicos, estos poseen desventajas inherentes, como una pobre estabilidad física y química a largo plazo, variabilidad de lote a lote y relativos altos costos, lo que ha llevado a los investigadores a desarrollar metodologías que se basan en la imitación de los sistemas biológicos; llamados biomiméticos [65]. Un área particular de los sistemas biomiméticos son los polímeros de impresión molecular (MIPs, del inglés *molecularly imprinted polymers*).

Los MIPs surgieron hace 40 años cuando Wulff and Sahana propusieron la estrategia de polimerización en presencia de una molécula plantilla o templado. Desde entonces, los MIPs han sido utilizados en múltiples aplicaciones gracias a sus excelentes propiedades, tales como, alta afinidad y selectividad, elevada resistencia a temperaturas extremas, variación de presión y cambios de pH.

El funcionamiento de estos sistemas se basa en la formación de sitios de reconocimiento específicos hacia la molécula plantilla, dado que esta es capaz de dirigir la orientación de los monómeros en un material polimérico. Este reconocimiento específico se basa en la creación, durante el proceso de polimerización de cavidades que son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al templado. El proceso continúa con la extracción del

templado, dejando las cavidades libres para el reconocimiento de esta misma molécula o moléculas análogas (Figura 1.12).

Comparado con la utilización de anticuerpos monoclonales sintéticos, la síntesis de MIPs es simple, rápida y puede ser llevada a cabo sin el uso de estudios pre clínicos que involucren animales. Adicionalmente, los MIPs muestran alta estabilidad y excelente propiedades mecánicas, más aún puede ser preparados para una gran variedad de moléculas plantilla.

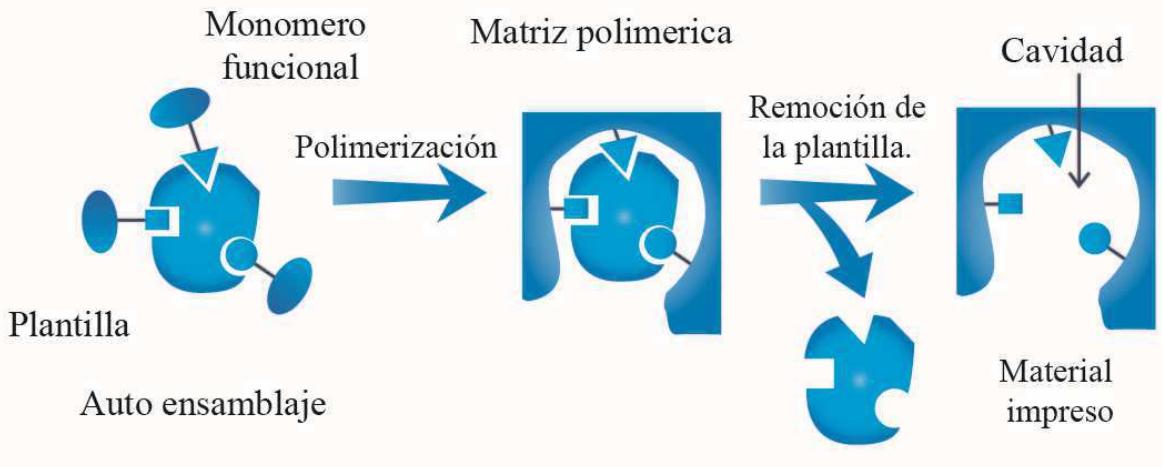


Figura 1.12.: Obtención esquemática de un polímero molecularmente impreso.

Los pasos en la síntesis de un polímero molecularmente impreso pueden resumirse en: 1) Se forma el complejo de pre-polimerización entre el templado y el monómero funcional, en presencia o no del solvente de reacción también llamado porógeno; 2) Luego se agrega el entrecruzante, iniciador y porógeno. La polimerización sigue en general un mecanismo de propagación radicalario. La polimerización puede ser inducida térmicamente o fotoquímicamente (en el caso de utilizar radiación ionizante, no se requiere el uso de iniciador; 3) Finalmente, se lava el polímero extrayendo el templado y dejando libre las

cavidades que son complementarias a este en tamaño, forma y funcionalidad química. Estas cavidades permitirían que el polímero impreso pueda interaccionar de manera selectiva con el analito de interés u análogos con estructuras similares.

Los polímeros molecularmente impresos, se han usado como sensores, para modificar membranas, como pseudo-fases estacionarias en electroforesis capilar, como fases estacionarias de columnas y capilares, en catálisis y en extracción en fase sólida [66].

1.2.2. El proceso químico de impresión molecular

El proceso químico de impresión molecular, consiste básicamente en 4 pasos generales: el primero es la **elección de la molécula molde** (templado o platilla) que va a depender de la finalidad por la cual se sintetice el MIP; luego el proceso de **generación de la huella molecular** puede ser llevado a cabo por 3 caminos diferentes: covalente, no-covalente y semi-covalente. Independientemente del enfoque dado para la generación de la huella molecular se debe dar inicio a la **polimerización**, y una vez terminado este paso se debe realizar una etapa de lavado para la **extracción de la molécula molde**.

1.2.2.1. Elección de la molécula molde (templado-plantilla)

Hasta la fecha se han desarrollado materiales molecularmente impresos para una amplia variedad de analitos, como por ejemplo: principios activos farmacéuticos [60, 61], [67] herbicidas y otras muchas sustancias de importancia e interés biológico [68] y/o medioambiental. En general se han utilizado moléculas molde de bajo peso molecular, ya que cuanto mayor es el tamaño y menor la rigidez del compuesto a imprimir, menor es la probabilidad de crear una cavidad bien definida y selectiva para la molécula. Por otra parte, dado que los procesos de reconocimiento y extracción de la molécula molde del polímero

implican fundamentalmente la difusión de la misma a través de la matriz polimérica hacia y desde la cavidad impresa, una molécula de gran tamaño encontrará impedimentos estéricos más importantes que una de menor tamaño. Rachkov y Minoura [69], han sugerido una solución para paliar esta situación, dado que cuando un anticuerpo reconoce a un antígeno, por lo general, no lo hace en su totalidad sino sólo una pequeña porción del mismo (epítopo), de la misma manera se puede sintetizar un material molecularmente impreso que solamente reconoce una zona característica de la molécula voluminosa. Gracias a esta solución, se han desarrollado materiales impresos capaces de reconocer no sólo a macromoléculas sino incluso células enteras en disolución [70].

1.2.2.2. Generación de la huella molecular: Modelos empleados en la síntesis

Los MIPs pueden ser elaborados por diferentes caminos y en diferentes formatos por ejemplo como films o membranas, micropartículas, nanopartículas. Independientemente del formato que adquiera el MIP, la síntesis del mismo puede seguir dos enfoques: covalente y no covalente.

El enfoque **covalente** se basa en la formación de enlaces covalentes reversibles que se producen entre el monómero y el templado durante el proceso de polimerización, este tipo de uniones aparecen también en el paso de unión del analito de interés a la cavidad preformada. Las ventajas de este tipo de polímero son su alta selectividad y gran homogeneidad de sitios activos. Siguiendo este enfoque se sintetizaron MIP para ser utilizados como fase estacionaria en columnas de HPLC. Los principales inconvenientes han sido, por un lado, el escaso número de monómeros capaces de formar enlaces covalentes reversibles con el templado, como así también el hecho de que se requiera sintetizar previo a

la polimerización un complejo “templado-monómero”, sobre el que tendrá lugar la polimerización y entrecruzamiento. Otro inconveniente reside en el hecho de que puede requerirse un tratamiento químico agresivo para romper el enlace covalente formado. Hasta el momento su aplicación analítica ha sido escasa.

En la síntesis de los polímeros a través de un enfoque **no covalente** están involucradas interacciones no covalentes en la formación del complejo de pre-polimerización monómero-templado, las uniones que gobiernan este tipo de enfoque son enlaces puente hidrógeno, como así también interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, este mismo tipo de interacciones se dan luego en el reconocimiento de analito. En este enfoque es necesario utilizar un exceso de monómero para estabilizar el complejo monómero-templado. Este método es más sencillo y versátil comparado con el método covalente, aunque pueden surgir problemas relacionados con la heterogeneidad de los sitios de unión dentro de las cavidades generadas.

Considerando las ventajas de los dos métodos anteriormente desarrollados, muchos autores suelen combinar ambos; en el proceso de síntesis, el templado se une a los monómeros a través de enlaces covalentes, y luego en el paso de unión del analito se utiliza el enfoque no covalente, a este tipo de enfoque se lo denomina **semi-covalente**.

Actualmente, los polímeros no covalentes son los más utilizados. Esto se debe por un lado, a la gran disponibilidad de reactivos capaces de producir estas interacciones de manera estable, y por el otro, a una mayor facilidad de síntesis en comparación a los polímeros covalentes y semi-covalentes, dado que el templado es usado directamente sin reaccionar previamente con el monómero como en los casos anteriores.

Este trabajo de tesis se enfocará en el diseño y síntesis de polímeros no covalentes, por lo que a continuación se profundizará sobre este tipo de polímeros.

1.2.2.3. Proceso de polimerización

En cualquiera de las rutas propuestas, covalente, no covalente o semi-covalente, es necesario iniciar el proceso de polimerización. Tras la mezcla de los monómeros funcionales con la molécula molde (en el caso de la síntesis no covalente) o la síntesis del derivado polimerizable (en el caso de la covalente) se adiciona un agente entrecruzador, típicamente dimetacrilato de etilenglicol, en mayor proporción molar que el monómero. Asimismo, se agrega también un agente iniciador de la polimerización, dicho iniciador es el encargado de generar los radicales que darán comienzo a la polimerización.

El proceso de iniciación de la polimerización puede ser de tipo térmico o fotoquímico. La elección entre uno u otro, depende fundamentalmente del tipo de molécula que se esté usando como molde. Si es una molécula termosensible, se utiliza una fuente de radiación ultravioleta, llevando a cabo la polimerización a 4°C. En el caso de una molécula fotosensible, se recurre a la temperatura como fenómeno generador de radicales.

Si una molécula es a la vez termo y fotosensible, es preferible recurrir a procesos de síntesis que no requieran iniciación radicalaria. La alternativa se encuentra en el empleo de materiales sol-gel, cuya polimerización se inicia simplemente mediante catálisis ácida o básica, eliminando la necesidad de temperatura o radiación que pueda dañar a la molécula molde.

1.2.2.4. Extracción de la molécula molde

Esta etapa tiene como finalidad la eliminación de la molécula molde del interior de la matriz polimérica, de manera que se genere una cavidad estable y complementaria en forma y

distribución de grupos funcionales a la mencionada molécula. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante procesos de lavado, extracción sólido/líquido, tratamiento térmico, digestión en microondas, e incluso utilizando agentes químicos que destruyan la molécula molde. La elección del procedimiento de lavado depende fundamentalmente de la ruta de síntesis elegida. Una simple etapa con un disolvente más polar que el empleado en la síntesis para los polímeros no covalentes o una hidrólisis ácida en el caso de polímeros preparados por vía covalente suelen ser los métodos más ampliamente utilizados.

1.2.3. Parámetros a evaluar en el desarrollo de MIPs

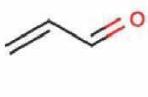
La correcta elección de los reactivos a utilizar en la síntesis del material impreso es de máxima importancia ya que de la misma depende que el fenómeno de reconocimiento molecular sea selectivo. Es posible sintetizar polímeros molecularmente impresos empleando compuestos de diferente naturaleza [71], por ejemplo: orgánicos (de base acrílica, poliuretanos, poliésteres, etc.), inorgánicos (p.e. polisiloxanos, polisilanos, policarbosilanos) u organometálicos (p.e. poligermanatos o poliestannatos), así como combinaciones de los anteriores. En la mayor parte de los materiales molecularmente impresos desarrollados hasta el momento se han empleado monómeros orgánicos; sin embargo, en la última década está cobrando interés la síntesis de materiales similares pero con base inorgánica, lo que requiere el uso de la tecnología sol-gel.

Como se infiere de lo anteriormente expuesto, los componentes fundamentales para la preparación de polímeros molecularmente impresos de naturaleza orgánica son: los monómeros funcionales, el entrecruzante, el iniciador de la polimerización y el disolvente porogénico o porógeno.

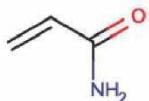
1.2.3.1. Monómero funcional

Los monómeros funcionales son responsables de las interacciones de la molécula plantilla en los sitios de unión impresos. En el caso del enfoque no covalente, se usa normalmente un exceso de monómeros en relación con el número de moles de plantilla para favorecer la formación de las cavidades, en proporción 4:1 y superiores. En general, el monómero funcional se selecciona en función de la naturaleza de la molécula molde [72]. Por ejemplo, si existen en ella grupos funcionales básicos, será adecuado para generar interacciones iónicas o de enlace de hidrógeno el empleo de precursores con grupos funcionales ácidos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido p-vinilbenzoico, etc). Por el contrario, si en la molécula molde hay presentes grupos ácidos la elección más apropiada sería la de bases hetero atómicas débiles como vinilpiridina. Finalmente, en el caso de que la molécula molde fuera capaz de formar complejos con determinados iones, el empleo de monómeros funcionales quelantes como el vinil-imidazol sería la opción más conveniente.

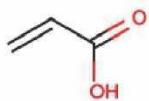
En la figura 1.13 se presenta la estructura de los monómeros funcionales más utilizados.



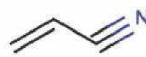
Acroleina



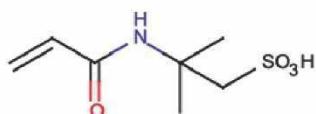
Acrilamida



Acidic sulfone



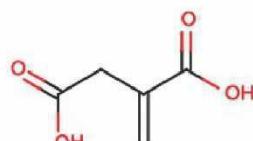
300



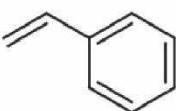
Acido acrilamido-2-metil-1-propanosulfonico



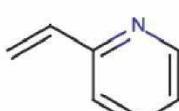
Alilamina



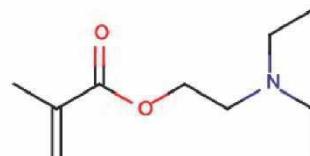
Ácido itacónico



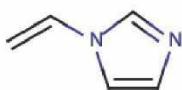
Vinil benceno



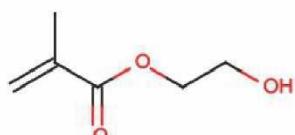
2-Vinil piridina



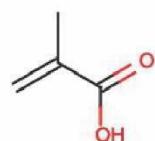
N,N-Dietil amino etil metacrilato



1-Vinil imidazol



2-Hidroxietil metacrilato



Acido metacrílico

Figura 1.13. Monómeros funcionales más utilizados en impresión molecular.

1.2.3.2. Entrecruzante

En un polímero impreso, el entrecruzante o reticulador cumple tres funciones principales. En primer lugar, es importante para controlar la morfología de la matriz del polímero, ya sea de tipo gel, macroporoso o un polvo de microgel. En segundo lugar, sirve para estabilizar el sitio

de enlace impreso. Finalmente, imparte estabilidad mecánica a la matriz del polímero. Mucho se ha escrito sobre el efecto del reticulante sobre el comportamiento de reconocimiento molecular de polímeros impresos, pero desde el punto de vista de la polimerización, generalmente se prefiere una elevada relación de reticulante para obtener materiales porosos (macroporosos) y para generar materiales con la estabilidad mecánica adecuada. Los polímeros con relaciones de entrecruzante superiores al 80% suelen ser la norma.

Entre los más comúnmente utilizados se pueden mencionar el dimetacrilato de etilenglicol y trimetacrilato de trimetilpropano para polímeros acrílicos y metacrílicos, el divinilbenceno para polímeros de estireno así como el triacrilato/ tetraacrilato de pentaeritrol para polímeros selectivos a péptidos. Las estructuras químicas de varios reticuladores se muestran en la figura 1.14.

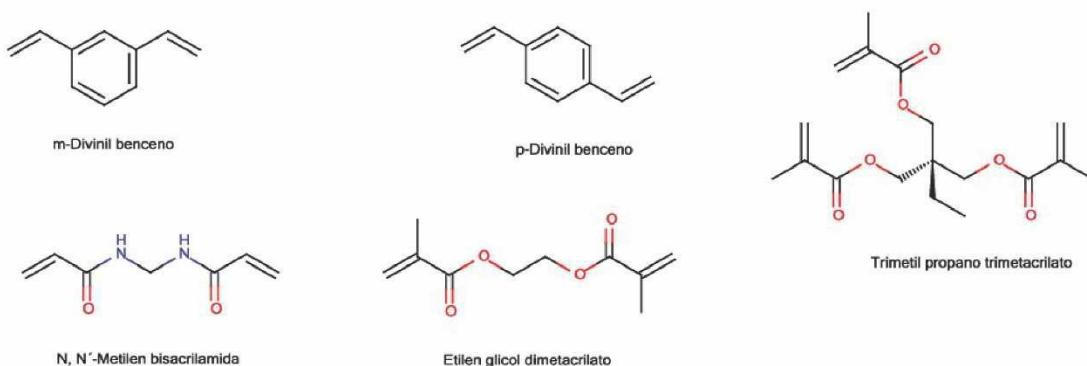


Figura 1.14. Entrecruzantes más utilizados en impresión molecular.

1.2.3.3. Porógeno

El porógeno sirve para disolver todos los componentes en el proceso de polimerización, es decir, homogeneizar la molécula plantilla o templado, el monómero funcional, el reticulante e iniciador en una fase. Sin embargo, cumple una segunda función importante ya que también

es responsable de crear los poros en polímeros macroporosos. Por esta razón, es bastante común referirse al solvente como el "porógeno". Cuando se preparan polímeros macroporosos, la naturaleza y el nivel del porógeno se pueden usar para controlar la morfología y el volumen total de poro.

La elección del disolvente en el que será llevada a cabo la síntesis es crítica en la mayoría de los polímeros impresos. Esto se debe a que la naturaleza del disolvente 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 por vía no covalente. Así por ejemplo, los disolventes con polaridad moderada como acetonitrilo o cloroformo, o con baja constante dieléctrica como tolueno y diclorometano son los más utilizados en la síntesis de polímeros orgánicos por vía no covalente ya que favorecen las interacciones entre molécula molde y monómeros funcionales. Si el disolvente es polar, compite con los monómeros funcionales por los puntos de interacción con la molécula molde.

1.2.3.4. Iniciador

Los iniciadores de la polimerización más empleados son compuestos de tipo azo, tales como el 2,2'-azobisisobutironitrilo o el azobis dimetil valeronitrilo, con los cuales se consigue una velocidad de reacción apropiada con un calentamiento de la mezcla de reacción moderado (50–60 °C). Cuando la molécula molde es térmicamente inestable es posible generar radicales libres a baja temperatura, por debajo de 4°C, mediante radiación UV empleando un fotoiniciador radicalario como, por ejemplo, la dimetoxifenil acetofenona.

1.2.4. Diferentes formatos de MIPs

Los MIPs se pueden sintetizar mediante una gran variedad de vías con el fin de optimizar su desempeño, tales métodos incluyen: polimerización en bloque, polimerización por precipitación, por suspensión, polimerización por hinchamiento en etapas, y recubrimiento de partículas esféricas.

En el presente trabajo de tesis se utilizó un MIP como sorbente para realizar SPE *off-line*, el mismo se sintetizó utilizando la metodología de polimerización en bloque, posteriormente, con la misma finalidad se trabajó en el recubrimiento de partículas de sílice con MIP.

Finalmente también se utilizó como soporte un electrodo de carbón vítreo con nanopartículas de oro electrodepositadas, para la preparación de un MIS en láminas delgadas.

1.2.4.1. Polimerización en bloque

La polimerización en bloque es una de las técnicas que más se utilizan para la obtención de MIPs. En la misma se utiliza una elevada concentración de monómero y templado, que se encuentran totalmente disueltos en el porógeno. Para la preparación de polímeros de este tipo, una vez que se efectúa la mezcla de reactivos, es necesario esperar el tiempo suficiente para que tenga lugar la polimerización, llevándose a cabo este proceso en un recipiente cerrado. Siguiendo éste procedimiento se obtiene un polímero en bloque que puede ser posteriormente particulado, moliéndolo y tamizándolo antes de su uso.

Entre las principales desventajas de este proceso podemos mencionar la pérdida de material durante el tamizado, la amplia distribución de tamaño de las partículas y la forma irregular de las mismas. Por otra parte, durante el proceso de molienda el calor y las tensiones generadas pueden modificar las características físico-químicas del polímero originando, por

ejemplo, nuevos sitios de unión no específicos. A pesar de sus desventajas, este formato es muy utilizado para evaluar el proceso de impresión tanto por técnicas dinámicas como estáticas debido a su simplicidad.

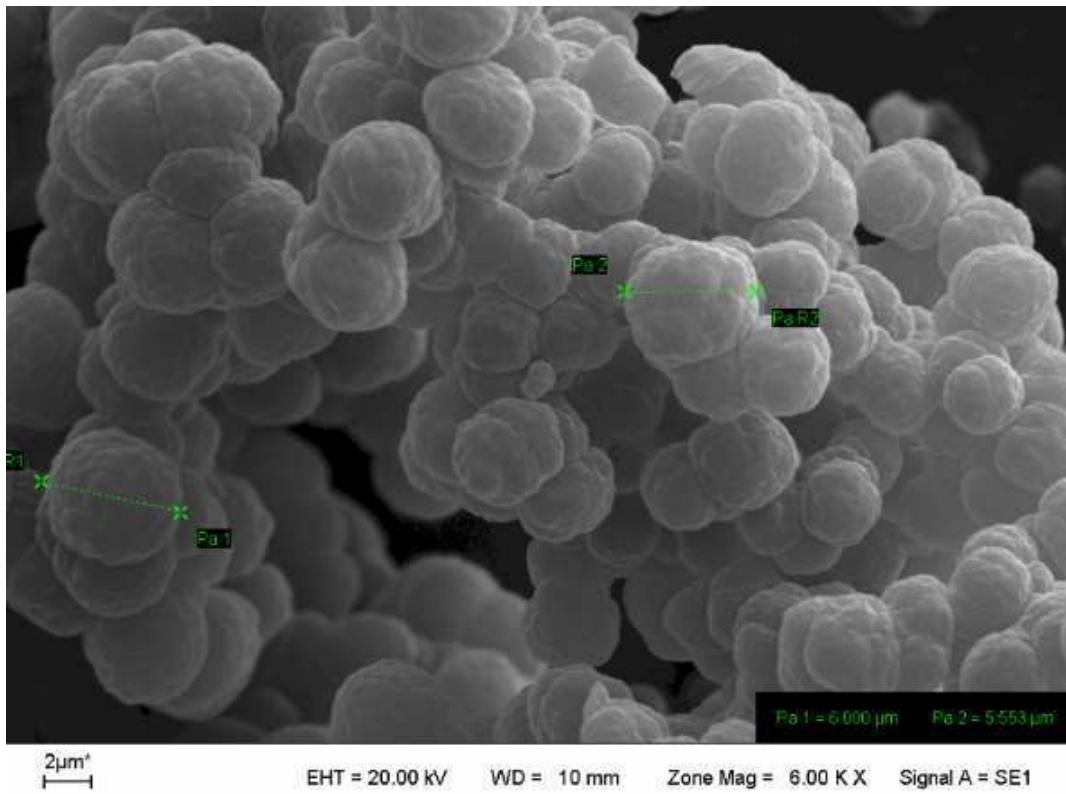


Figura 1.15. Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de un MIP obtenido vía polimerización en bloque [73]

1.2.4.2. Polimerización por precipitación

Con esta metodología se pueden obtener microesferas de MIP de tamaño más uniforme utilizando una solución más diluida de templado y monómero. Así, las cadenas poliméricas pueden crecer en forma individual sin superponerse ni formar coalescencia. A medida que se forma el polímero, las partículas micro esféricas precipitan en la solución. En comparación

con la polimerización en bloque, si el procedimiento se realiza por precipitación necesita una gran cantidad de solvente orgánico y un control muy estricto de las condiciones de reacción. Esto se debe a que algunos factores como la polaridad de los solventes, la temperatura de polimerización y la velocidad de agitación tienen gran influencia sobre el tamaño de partícula del polímero.

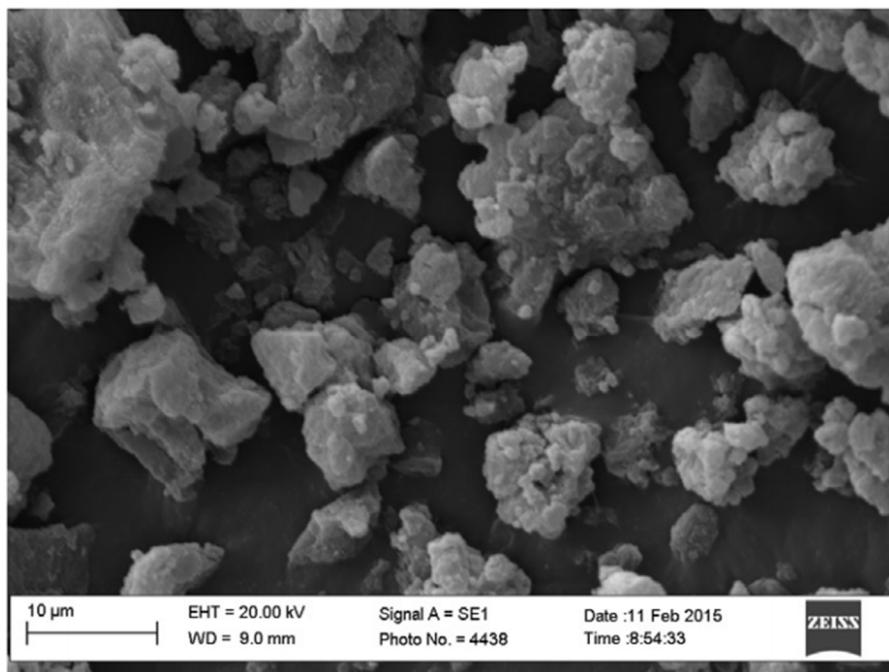


Figura 1.16. SEM de un MIP obtenido por precipitación [74].

1.2.4.3. Polimerización por suspensión

La polimerización por suspensión se realiza en un sistema heterogéneo formado por dos fases, una acuosa y otra hidrófoba que puede ser un aceite mineral o solución de perfluorocarbono. El método tiende a producir gotas con un tamaño que va desde micrómetros a milímetros y muestra un reconocimiento pobre debido a la alteración del medio dispersante. Esta metodología no es adecuada para aplicaciones de SPE [75–77].

1.2.4.4. Polimerización por hinchamiento en etapas

El método por hinchamiento en varias etapas permite obtener MIP esféricos de diámetro controlado, a este método también se lo denomina polimerización de semillas. Las partículas obtenidas usando esta técnica son comparativamente monodispersas en tamaño y forma y son adecuadas para aplicaciones cromatográficas. Sin embargo, el procedimiento de múltiples etapas presenta la desventaja de consumir mucho tiempo, y las suspensiones acuosas usadas podrían interferir con la impresión y conducir así a una disminución en la selectividad [78–80].

1.2.4.5. Partículas esféricas recubiertas

Los polímeros impresos pueden obtenerse en forma de pequeñas esferas de diferentes tamaños si la síntesis del mismo se realiza en condiciones operacionales adecuadas, por ejemplo en presencia de un exceso de disolvente. Para solventar este inconveniente se han utilizado partículas esféricas recubiertas. En esta configuración una capa de material molecularmente impreso recubre la superficie de una esfera que ha sido previamente activada. En general se utilizan como soporte perlas de sílice, poliestireno y trimetacrilato de poli trimetilolpropano. Los grupos funcionales presentes en estas perlas permiten el anclaje del polímero y por lo tanto un recubrimiento superficial efectivo. Al utilizar esta configuración, los sitios de enlace son más accesibles para la molécula molde, por lo que la transferencia de masa y cinética de enlace son más rápidas.

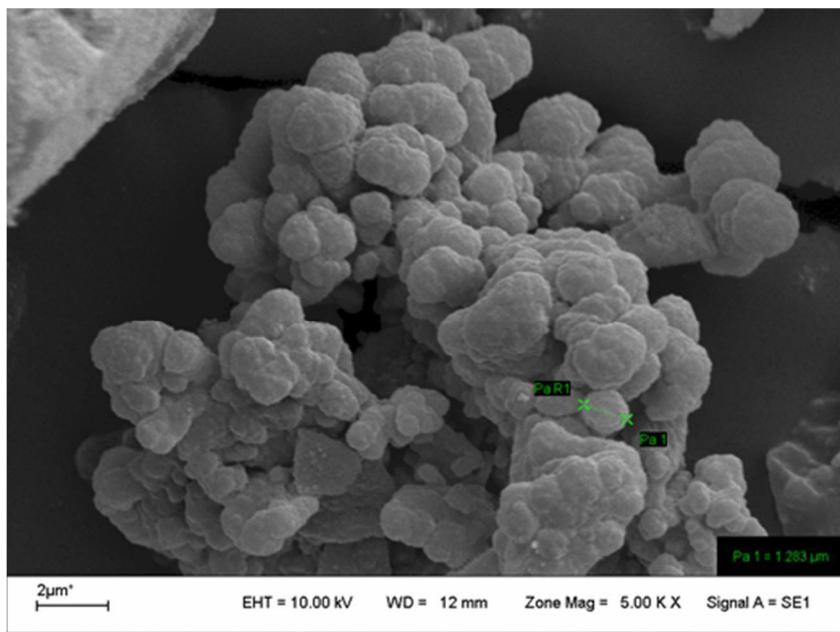


Figura 1.17. SEM de partículas de Silica recubiertas con MIP [81].

1.2.4.6. Polimerización en láminas delgadas

Es posible efectuar la preparación de un polímero impreso en láminas delgadas por inmersión del elemento seleccionado como soporte (placa de vidrio, placas de oro, electrodos, etc) en la mezcla de reactivos (cobertura por inmersión o *dip-coating*) o mediante el empleo de un *spin-coater* (cobertura por rotación, o *spin-coating*) (Fig 1.18). Este formato presenta como ventajas la obtención de cavidades con forma y tamaño bien definidos que no sufren alteraciones debido a que no son necesarios procesos de acondicionamiento posteriores (molienda, tamizado) y por la fácil accesibilidad de la molécula en estudio a prácticamente la totalidad de los sitios activos del material. Debido a estas características la configuración en láminas delgadas es la más utilizada para aplicaciones en sensores, principalmente debido a sus rápidos tiempos de respuesta y sencillez de uso.

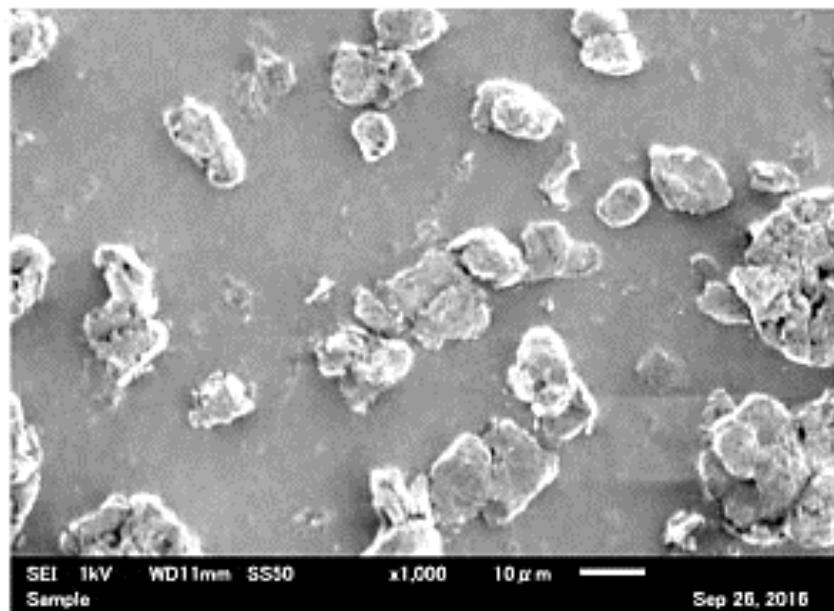


Figura 1.18. Electrodo de grafito modificado con MIP [82]

1.2.5. Técnicas de caracterización

Los polímeros de red macroscópicos son notoriamente difíciles de caracterizar en gran parte debido a su naturaleza insoluble. Los polímeros impresos no son una excepción, no obstante lo cual, es posible un grado de caracterización [72] que diferenciaremos en tres niveles: caracterización química, caracterización morfológica y caracterización del comportamiento de reconocimiento molecular. En este apartado realizaremos una breve consideración de los aspectos de caracterización química y morfológica, enumerando algunas de las principales técnicas disponibles y la información que se puede extraer de cada una de ellas.

1.2.5.1. Caracterización Química

Dada su naturaleza insoluble, los MIP generalmente no pueden ser caracterizados por métodos que impliquen que la muestra se encuentre en estado líquido, como la resonancia

magnética nuclear (RMN) en solución. Los métodos analíticos que se pueden utilizar con muestras sólidas incluyen:

1.2.5.1.1. Microanálisis elemental

El microanálisis elemental se puede utilizar de forma rutinaria para medir el porcentaje en masa de carbono, hidrógeno, nitrógeno, cloro, etc. dentro de las muestras. Cuando esta técnica se aplica al análisis de polímeros, la información de composición elemental obtenida a menudo se puede usar para calcular la composición del monómero; tales cálculos son particularmente sencillos de realizar cuando los monómeros tienen un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno en la 4-vinilpiridina. Desafortunadamente, el método no es suficientemente sensible para permitir la detección de cantidades residuales de plantilla que pueden permanecer en los MIP luego de los procesos de lavado.

1.2.5.1.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de polímeros impresos pueden adquirirse fácilmente, para este fin se puede utilizar un disco de KBr que incorpore el polímero o simplemente el polímero como tal. Esta técnica nos brindará información cuantitativa sobre la composición del polímero. El método es de particular valor cuando los diferentes entornos químicos en la muestra (por ejemplo, que surgen del monómero funcional y del reticulante en un polímero impreso) dan lugar a señales definidas. También es posible usar FTIR para investigar interacciones no covalentes, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, aunque la baja sensibilidad de la técnica establece límites en su utilidad en este sentido.

1.2.5.1.3. RMN en estado sólido

Las técnicas de RMN de estado sólido eluden la necesidad de trabajar en solución y, por lo tanto, permiten que se adquieran los espectros de RMN de especies insolubles. Para los polímeros de red, se puede obtener información sobre los diferentes entornos químicos presentes en la muestra. Esta técnica también se utilizó para el estudio de las interacciones plantilla-monómero funcional. Sellegren y colaboradores demostraron por primera vez evidencia directa de la formación de una interacción no covalente plantilla-monómero funcional mediante un estudio por RMN.

A partir de este estudio se demostró una baja asociación entre las moléculas utilizadas como plantilla y la formación de una gran cantidad de complejos plantilla-monómero funcional.

1.2.5.2. Caracterización Morfológica

Es posible investigar la morfología de los polímeros impresos de la misma manera que se puede hacer con la mayoría de los sólidos porosos. Dependiendo del método de análisis, se puede obtener información útil sobre el volumen de poro, tamaño de poro, distribuciones de tamaño de poro y áreas de superficie específicas de los materiales específicos. Los métodos analíticos adecuados incluyen:

1.2.5.2.1. Experimentos de absorción de solventes

Los polímeros macroporosos mantienen esta característica incluso en estado seco y el solvente puede usarse para acceder a la red de poros. Al medir la cantidad de disolvente captado por un polímero, se puede hacer una estimación del volumen específico de poro (mL^{-1}g).

1.2.5.2.2. Porosimetría de sorción de nitrógeno

La porosimetría de sorción de nitrógeno utiliza una porción de polímero seco que se expone a un gas (generalmente nitrógeno) a una serie de presiones fijas. Midiendo la cantidad de gas adsorbido en función de la presión, se pueden construir isotermas de sorción a partir de las cuales, siguiendo la aplicación de la teoría (BET), se obtiene información sobre el área superficial específica ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), el volumen específico de poro ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$), y también se pueden conocer el diámetro medio y la distribución del tamaño de poro. El método es particularmente útil para analizar en detalle los poros de tamaño medio (meso) y pequeño (micro). Las definiciones de tamaño IUPAC para los poros son: microporos <2 nm; 2 nm <mesoporos <50 nm; 50 nm<macroporos).

1.2.5.2.3. Porosimetría de intrusión de mercurio

La porosimetría de intrusión de mercurio implica la inyección de una cantidad de mercurio bajo presión, a una masa fija de polímero seco. La información que se puede obtener de tales experimentos es similar a la que se puede obtener de la porosimetría de sorción de nitrógeno, aunque generalmente es más sensible al explorar poros más grandes (macro).

1.2.5.2.4. Cromatografía Inversa de Exclusión de tamaño (ISEC)

En contraste con la porosimetría de absorción de nitrógeno y la porosimetría de intrusión de mercurio, que analiza los polímeros en estado seco, ISEC permite analizar la estructura porosa de los polímeros en estado húmedo. Esto es significativo en lo que respecta a los polímeros impresos ya que los polímeros impresos encuentran aplicaciones, la mayoría de las veces, en estado húmedo. En un experimento ISEC típico, el sólido poroso, en este caso

el MIP, es la fase estacionaria para un sistema de flujo continuo y se evalúa el tiempo necesario para eluir una serie de patrones de masa molar conocida a través de la columna a un caudal fijo. Tras la aplicación de modelos matemáticos adecuados, se puede extraer información sobre la estructura de los poros del polímero. En muchos aspectos, ISEC se puede ver como una técnica complementaria a la porosimetría de absorción de nitrógeno y la porosimetría de intrusión de mercurio, con la ventaja de que puede operar en estado húmedo.

1.2.5.2.5. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía se puede usar de formas distintas para sondear polímeros impresos en una variedad de escalas de longitud. Por ejemplo, la microscopía óptica se puede utilizar para verificar la integridad estructural de las perlas de polímero, mientras que la microscopía electrónica de barrido (SEM) a menudo se puede utilizar para obtener imágenes de macroporos.

Para la caracterización química de los polímeros (MIP/NIP) sintetizados para el presente trabajo de tesis, se utilizó la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Asimismo para la caracterización morfológica se utilizaron; porosimetría de sorción de nitrógeno, porosimetría de intrusión de mercurio y microscopía electrónica de barrido.

1.2.6. Aplicaciones

Los MIP se usan ampliamente como materiales para técnicas de pretratamiento de muestras; como sorbentes en técnicas cromatográficas y en sistemas de detección (detección electroquímica, detección de fluorescencia, etc.), para el análisis de moléculas activas, productos farmacéuticos, contaminantes ambientales, etc.

En este trabajo de tesis, se utilizaron MIP con dos perspectivas, la primera fue como sorbentes de relleno en columnas para extracción en fase sólida y pretratamiento de muestra, y en segundo lugar como materiales para la modificación de sensores en sistemas de detección.

En este apartado se introducirán brevemente las aplicaciones más comunes de los MIPs.

1.2.6.1. Pretratamiento de Muestra y Separación Cromatográfica.

1.2.6.1.1. Extracción en fase sólida (MISPE)

La aplicación de los MIPs como sorbentes en SPE, denominada extracción en fase sólida con impresión molecular (MISPE) permite no solo la preconcentración y limpieza de la muestra, sino también la extracción selectiva del analito de interés. Esto es particularmente útil cuando la muestra es compleja y las impurezas pueden interferir en la cuantificación. Los sorbentes MISPE pueden empaquetarse en diferentes formas, como cartuchos, discos, placas de microtitulación, precolumnas, entre otros.

La figura 1.19 (a) muestra el procedimiento de empaquetado del polímero sintético en un cartucho de SPE vacío. El cartucho MISPE se acondiciona y se activa con un disolvente de características similares a la muestra a analizar, para luego cargar en él las muestras que contienen los analitos de interés. Posteriormente, se realiza un proceso de lavado para eliminar las moléculas no absorbidas y luego se eluye el/los analito/s diana con un disolvente adecuado. En la Fig. 1.19 (b) se puede observar el procedimiento general de MISPE.

Los principales factores que influyen en este proceso son la preparación del MIP, la carga de muestra, los solventes de lavado y la elución [83]. Para obtener buenos rendimientos en el proceso MISPE, el material sorbente debe tener buena capacidad de adsorción, alta

selectividad y estabilidad. Por lo tanto, la síntesis del polímero debe estudiarse en detalle para obtener buenos resultados.

El paso de lavado también es un factor de importancia en el procedimiento MISPE. El objetivo es permitir que el analito diana se retenga selectivamente, mientras que los interferentes sean eliminados en este paso [84]. Por lo tanto los analitos deben estar fuertemente ligados a los sorbentes MIP para que los solventes de lavado no puedan eluirlos.

Basándonos en el punto anterior, se enumeran a continuación algunos solventes que son ampliamente utilizados: diclorometano, acetonitrilo, metanol, acetona y agua. [85–88]. El último paso de MISPE es eluir los analitos de interés del MIP utilizando un solvente específico. El disolvente de elución debe ser lo suficientemente fuerte como para liberar los analitos de los sitios de unión. Para obtener altos factores de enriquecimiento, es necesario utilizar un pequeño volumen de eluyente o realizar un paso de evaporación para concentrar los analitos [89].

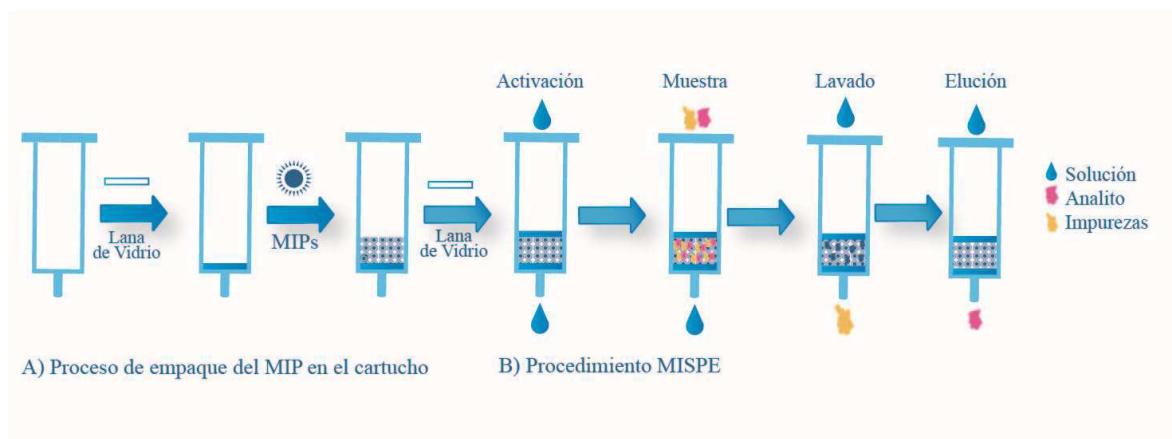


Figura 1.19. Diagrama de un proceso de MISPE *off-line* tradicional

Debido a la alta selectividad de los MIP para la molécula plantilla y sus análogos estructurales, los métodos MISPE ya se han aplicado al análisis ambiental, [90–93] de alimentos [94–96] en el campo biológico [97, 98] etc. Además, algunas empresas ya han desarrollado cartuchos comerciales de SPE, empaquetando MIPs específicos para la determinación de analitos diana [99]. Se han desarrollado varios modos de MISPE que se pueden clasificar como MISPE *off-line*, [100–102] MISPE *on-line*, SPE dispersiva [103–105] (DSPE) [106] y dispersión de fase sólida de matriz (MSPD) [107–109]. Los modos más utilizados son MISPE *off-line* y MISPE *on-line*.

MISPE off-line: Hasta el momento, la mayoría de los métodos MISPE se han realizado *off-line*, que es similar a la técnica de SPE *off-line* con sorbentes convencionales, tales como sílica y C18. La razón principal es que la instrumentación necesaria es sencilla, y se pueden utilizar muchos tipos de solventes y aditivos para la elución sin considerar su influencia en los instrumentos analíticos. Para la determinación de diversos analitos en muestras medioambientales (agua de río, agua de lago, aguas residuales, agua de mar, aguas subterráneas, extractos de suelo, etc.), alimentos, plantas medicinales y muestras biológicas (suero, orina, sangre, plasma, etc.), se utiliza MISPE en combinación con otras técnicas analíticas tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [110], cromatografía de gases (GC) [111], electroforesis capilar (CE) [112, 113] y espectrometría UV-Vis [114]. El método preferido para sintetizar MIP como sorbente para MISPE *off-line* es la polimerización en bloque.

MISPE on-line Hay varias ventajas del MISPE *on-line*, como la reducción de la pérdida de analitos y el riesgo de contaminación, acortamiento del tiempo de pretratamiento de muestra, disminución del consumo de solventes y mejor reproducibilidad.

Para este tipo de metodologías, el polímero debe proporcionar una rápida transferencia de masa y tener buenas propiedades de flujo, para evitar obstrucciones en el instrumental.

1.2.6.1.2. Separación cromatográfica

Además de su amplia gama de aplicaciones en técnicas de pretratamiento, los MIP también se utilizan como fases estacionarias en técnicas de cromatografía, como HPLC [115], electrocromatografía capilar (CEC) [116], cromatografía líquida capilar (CLC) [117] y cromatografía en capa fina (TLC) [118], debido a su alta afinidad y selectividad para los analitos diana.

Las técnicas cromatográficas de separación, son las que probablemente se han visto más beneficiadas con el advenimiento de la tecnología de impresión molecular. Pese a la gran selectividad que presentan estos materiales, en ocasiones el fenómeno de adsorción inespecífica o una cinética lenta dificultan su utilización en el campo de los sensores. Sin embargo, 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 ésta atraviesa el polímero, permitiendo su separación. La combinación de la impresión molecular con la cromatografía líquida de alta resolución ha resultado tan eficaz, que se han descrito trabajos que permiten la separación de enantiómeros en mezclas racémicas, utilizando como fase estacionaria un polímero impreso con uno de los enantiómeros puros [119].

1.2.6.2. En sistemas de detección

El empleo de sensores basados en MIP, fue propuesto por primera vez por Mosbach con el objetivo de lograr la unión específica de la vitamina K1 a una superficie de silicio "impresa" mediante el uso de elipsometría de superficie óptica [120], esta técnica ha logrado un progreso considerable debido a sus buenas características de selectividad, estabilidad, simplicidad, rentabilidad y versatilidad en los campos de diagnóstico clínico, control ambiental, análisis de alimentos y detección de drogas [121–124]. El rasgo característico de los sensores basados en MIP es que los MIP tienen propiedades de reconocimiento y transducción, es decir, los MIP como elementos de reconocimiento pueden unirse específicamente a analitos objetivo y como elementos de transducción pueden generar señales de salida para la detección. La característica y construcción básica de los sensores basados en MIP se ilustra esquemáticamente en la figura 1.20 (a). Como se ve en la figura, típicamente, las señales de detección de salida se pueden clasificar en 3 tipos, electroquímicos, ópticos y piezoeléctricos según el mecanismo de transducción. Y los transductores utilizados son electrodos, transpondedores ópticos y cristales piezoeléctricos, respectivamente. En general, para la determinación analítica, es necesario considerar los principales parámetros de los sensores basados en MIP, como el tiempo de respuesta, el rango dinámico lineal, la detectabilidad, la sensibilidad, la selectividad y la reproducibilidad.

1.2.6.3. Detección electroquímica

Desde el primer informe publicado por Hedborg, [125] los sensores electroquímicos impresos molecularmente (MIECSs) han recibido atención debido a su alta sensibilidad y selectividad, bajo costo y la posibilidad de miniaturización y automatización. Para MIECSs, los MIP se presentan en forma de partículas o películas delgadas depositadas sobre los

electrodos, las cuales se preparan por electropolimerización de monómeros como pirrol, anilina, o-fenilendiamina (o-PD), p-aminobencenotiol (p-ATP) y 3,4-etilendioxitofeno (EDOT), [126] y sistemas misceláneos como monocapas autoensambladas (SAM), sol-geles y polímeros preformados. Según la señal de respuesta, los sensores electroquímicos se pueden clasificar principalmente en los siguientes cuatro tipos: corriente eléctrica (amperometría y voltametría), potenciometría (electrodos selectivos de iones y transistores de efecto de campo), capacitancia y conductividad. Su capacidad de reconocimiento se basa comúnmente en polímeros que se encuentran cubriendo la superficie de transductores en forma de monolitos o membranas, y las señales del transductor electroquímico se derivan de los analitos mismos, sondas electroquímicas, o la unión de analitos a MIP, dando como resultado la cuantificación de los analitos de interés. La figura 1.20 (b) ilustra esquemáticamente los mecanismos básicos y los principales tipos de MIECS.

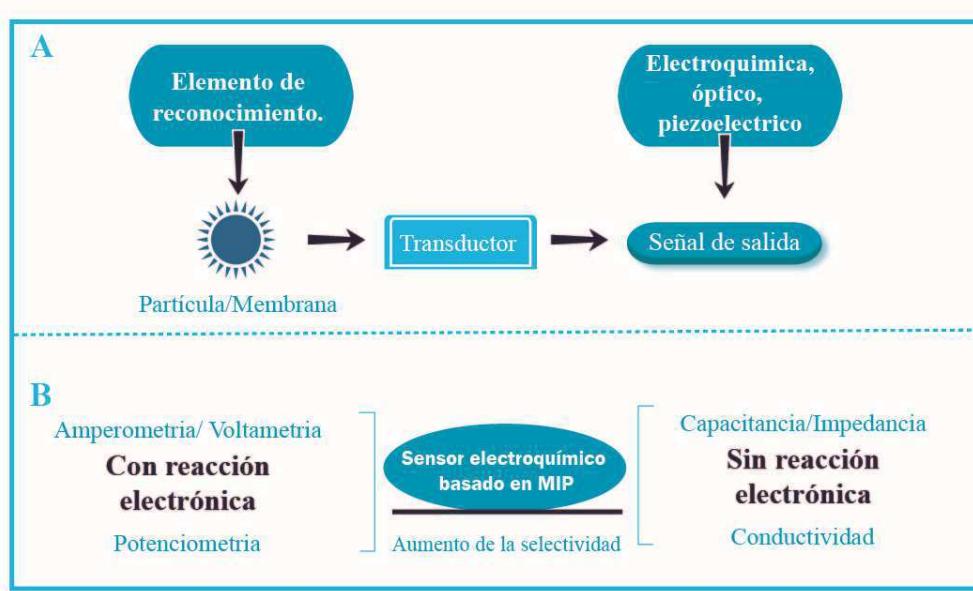


Figura 1. 20. (A) Representación esquemática de sensores basados en MIP. (B) Diagrama de los principales tipos y mecanismos básicos de sensores electroquímicos impresos molecularmente (MIECS).

1.2.6.4. Dispensadores de medicamentos

A pesar de que se han descrito numerosas aplicaciones analíticas de la tecnología de impresión molecular, el uso de los MIPs en farmacología y química medicinal resultan las más atractivas. El empleo de estos materiales como dispensadores de medicamentos en forma controlada (*drug-deliverers*) es de principal importancia debido a la simpleza de la técnica y los beneficios terapéuticos que brinda. La habilidad del polímero molecularmente impreso para unirse al analito (principio activo) de interés con elevada afinidad ha permitido su aplicación, por ejemplo como excipiente [127]. La permeabilidad a través del material impreso será más lenta que la que ocurre si se utilizase uno no impreso; de esta forma, es posible extender el perfil de liberación del principio activo modificando la composición del polímero empleado [128]. Pero el potencial de estos materiales va más allá. Recientemente, se están llevando a cabo investigaciones que pretenden utilizar polímeros impresos como portadores inteligentes de medicamentos. Una de las formas más sencillas de hacerlo consiste en liberar el producto mediante un desplazamiento competitivo del mismo con una molécula estructuralmente análoga, que actuaría como activador de la dosificación. Alternativamente, podrían diseñarse polímeros impresos con actividad "alostérica" [128], es decir, con capacidad de liberar el medicamento al reaccionar con una molécula diferente, que sería el activador en este caso. En teoría, sería incluso posible que este diseño alostérico de los polímeros impresos permitiera la liberación del medicamento en el interior de determinadas células, convirtiéndose en una poderosa herramienta contra enfermedades como las producidas por algunos virus o ciertos tipos de cáncer [129].

1.2.6.5. En procesos catalíticos

Otra de las aplicaciones más extendidas de los polímeros de impresión molecular es como catalizadores. 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 [130]. Basándose en este principio, otros autores diseñaron y sintetizaron materiales impresos con análogos estructurales, de forma que los polímeros obtenidos pueden ser empleados como catalizadores [131]. El primer ejemplo de sílice impresa empleada para catalizar una reacción química fue publicado por Morihara y colaboradores [132]. En este trabajo la sílice se imprimió con un análogo estructural del estado de transición para la butanólisis del anhídrido benzoico, resultando un polímero con capacidades catalíticas para la mencionada reacción. Una variante a la impresión clásica de sílice es la llevada a cabo por Katz y Davis, en la que se modifica superficialmente la sílice amorfa empleando un compuesto aromático con sustituyentes silanos. La posterior eliminación de los grupos aromáticos, genera un material que actúa como catalizador morfoselectivo [133]. Los polímeros orgánicos también pueden utilizarse con esta finalidad. Zhang y colaboradores, han empleado monómeros orgánicos para sintetizar materiales impresos empleados como nanoreactores para una reacción regioselectiva de cicloadición [134]. Adicionalmente, pueden generarse materiales impresos a partir de complejos metálicos polimerizables. Becker y Gagné, por ejemplo, aprovechan la sinergia entre la química de coordinación y el fenómeno de impresión molecular para la búsqueda de nuevos materiales catalíticos [135].

1.3. Nanomateriales

En un sentido amplio la nanociencia es el conjunto de saberes y metodologías dirigidos a estudiar, fabricar y caracterizar estructuras funcionales con dimensiones inferiores a unas pocas decenas de nanómetros. El estudio de dichas estructuras incluye el análisis de sus propiedades estructurales, mecánicas, eléctricas, magnéticas, químicas, el estudio de su interacción con otras nanoestructuras, su interacción con ondas electromagnéticas, su interacción con medios biológicos, etc.

El impacto de la nanotecnología en la vida moderna aún parece una historia de ciencia ficción. Fármacos que trabajan a nivel atómico, microchips capaces de realizar complejos análisis genéticos, catálisis, almacenamiento de datos, generación de fuentes de energía inagotables, construcción de edificios con microrobots, combates de plagas y contaminación a escala molecular, son algunos de los campos de investigación que se desarrollan con el uso de la nanotecnología. Vinculado a la investigación científica, la nanotecnología fomenta un modelo de colaboración interdisciplinario en campos como la llamada nanomedicina (aplicación de técnicas que permitan el diseño de fármacos a nivel molecular), la nanobiología y la nanoelectrónica, entre otras.

A pesar de que hace solo una década que comenzó el “despegue mundial” de este nuevo campo científico, hoy existen cerca de 3000 productos generados de nanotecnología, la mayoría para usos industriales. Todo ello se debe a las posibilidades que aparecen al permitir la manipulación de la materia a escala atómica y molecular, para crear nuevos materiales y procesos basándose en el comportamiento que tiene la materia a escala nanométrica. La síntesis racional de nanomateriales con propiedades específicas constituye uno de los retos más interesantes en este campo. En general, la síntesis de nanomateriales puede plantearse

siguiendo dos tipos de procedimientos: el *top-down* (empezar desde arriba e ir hacia abajo) y el *bottom-up* (empezar desde abajo e ir subiendo). En los procesos de fabricación *top-down*, el punto de partida es una pieza de material del tamaño macroscópico que por maquinado, o siguiendo los métodos apropiados, se va reduciendo al tamaño deseado. Este procedimiento es el que se emplea actualmente para la fabricación de circuitos integrados. En los procesos de fabricación *bottom-up* el objetivo es construir nanoestructuras átomo a átomo o molécula a molécula. Por lo tanto, aquí entran en juego las técnicas de síntesis química molecular y el ensamblaje de moléculas o nanopartículas.

1.3.1. Nanopartículas Metálicas: Oro

Las nanopartículas metálicas se caracterizan por poseer una estructura electrónica en la que la longitud de onda de De Broglie de los electrones de valencia es del mismo orden que el tamaño de las nanopartículas. Una consecuencia de ello es que las nanopartículas se comporten como cajas cuánticas en las que se encuentran confinados dichos electrones que pueden oscilar colectivamente dentro de ese espacio. La interacción de estos electrones con la luz da lugar a la aparición en el espectro de absorción UV-Vis de las denominadas bandas de resonancia plasmónica. Esta absorción proporciona a las nanopartículas colores intensos característicos y por ello se han utilizado este tipo de materiales desde el siglo XVII aunque se desconocía su naturaleza. Las nanopartículas de oro (AuNPs, por sus siglas en inglés), que proporcionan colores rojizos y rosados, se han empleado para dar color a vidrios y para colorear vasijas y otros utensilios. También las nanopartículas metálicas permiten modificar la luminiscencia de compuestos fluorófobos y tienen importancia, por ejemplo, en el desarrollo de nuevas técnicas de detección de analitos a nivel de trazas.

Además del tamaño, otro factor fundamental que determina las propiedades y el comportamiento de las nanopartículas es su morfología. La forma de las nanopartículas condiciona las posibilidades de asociación de unas con otras para generar ordenaciones supramoleculares útiles para la fabricación de diferentes dispositivos electrónicos. La reactividad química se ve también drásticamente modificada por la geometría de estos sistemas.

En este sentido, se ha observado que los átomos que constituyen las nanopartículas tiene diferente reactividad dependiendo de la posición que ocupen (vértices, aristas o caras) y ello es fundamental para comprender y racionalizar, por ejemplo, sus propiedades como catalizadores eficientes en una gran variedad de procesos. Las características físico-químicas únicas de las nanopartículas producen incluso la aparición de propiedades inesperadas para algunos metales como es el caso del magnetismo exhibido por ciertas AuNPs, cuyo origen no está explicado y ha despertado una gran curiosidad en la comunidad científica. Precisamente la síntesis controlada de nanopartículas es uno de los mayores objetivos en la química de materiales modernos, puesto que su tamaño y forma modulan las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas. Los métodos utilizados para la síntesis de nanopartículas metálicas son muy diversos:

- Reducción química a partir de las sales del metal (con borohidruro de sodio, hidracina, entre otros).
- Descomposición térmica, fotoquímica de vapor o por ultrasonido.
- Reducción electroquímica.
- Reducción y desplazamiento de organometálicos.

Hay que destacar el papel que juegan los ligandos estabilizantes de las nanopartículas que controlan su tamaño evitando la formación de grandes agregados metálicos. Los estabilizantes que se pueden usar son muchos, dependiendo de la naturaleza de las nanopartículas, pero en general son ligandos basados en nitrógeno, fósforo y azufre, dadores, surfactantes, polímeros y dendrímeros. En el caso de las AuNPs, que son posiblemente las más estudiadas, se usan como agentes estabilizantes principalmente organotioles, isonitrilos, sales de amonio, sales de diazonio, sales de yodonio, tiocianatos y alquinos. Los estabilizantes pueden evitarse en la síntesis por reducción electroquímica debido a que en este método las nanopartículas se forman sobre una superficie sólida (electrodo), impidiéndose de este modo su aglomeración.

Aunque la síntesis de nanopartículas con control de forma ha sido ampliamente estudiada, los trabajos encaminados a esclarecer el mecanismo de formación de las nanopartículas son pocos y todavía hay aspectos que no están suficientemente claros. Está bien establecido que la formación se produce en dos etapas (Fig. 1.21):

Primero tiene lugar la nucleación que supone la formación de pequeños *clusters* con un número pequeño de átomos. Estos sistemas, para ser estables, deben adquirir un tamaño mínimo que viene determinado por lo que se conoce como radio crítico. En el caso de no alcanzar ese radio crítico, los pequeños gérmenes formados se redissuelven y no dan lugar a la formación de núcleos.

A continuación, estas pequeñas partículas iniciales sufren un proceso de coalescencia (se unen para formar agregados más grandes) o se redissuelven favoreciendo el crecimiento de otras partículas (*Ostwald ripening*), para evolucionar hasta adoptar su tamaño y forma finales.

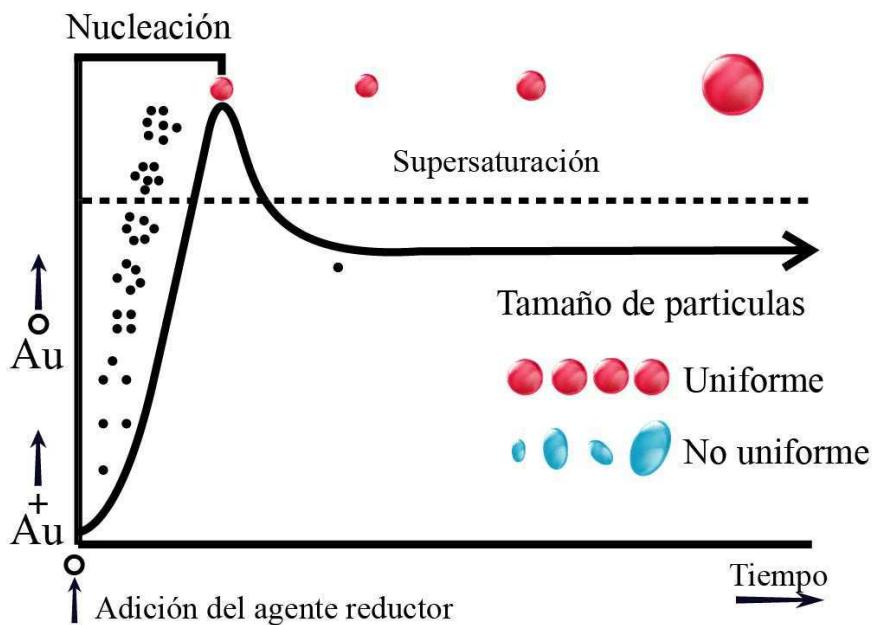


Figura 1.21. Reducción de oro iónico para formar nanopartículas de oro.

El control de las condiciones en las que se producen estas etapas, como por ejemplo el pH o la concentración de compuestos inicial, permite preparar nanopartículas con formas y tamaños determinados. Sin embargo, los estudios mecanísticos en los que se describen los procesos químicos implicados en la formación de las nanopartículas, como se ha indicado, son muy escasos.

En la bibliografía se han encontrado diversas estrategias para la modificación de diferentes superficies electródicas con nanopartículas, entre las que podemos destacar:

- La unión de las nanopartículas a los grupos activos de monocapas autoensambladas.
- La adsorción de las nanopartículas sobre la superficie electródica por inmersión del electrodo en una disolución coloidal durante un tiempo determinado.

- La inmovilización directa de las nanopartículas sobre la superficie electródica mediante electrodeposición del nanomaterial, para lo cual se sumerge el electrodo en una disolución y se aplica un potencial durante un tiempo determinado. La variación del potencial aplicado y el tiempo de aplicación permiten controlar el tamaño de las partículas electrodepositadas.
- La incorporación a la matriz en el caso de emplear electrodos compósitos.

En los últimos años, los diseños electródicos basados en nanopartículas metálicas, especialmente de metales nobles, están siendo ampliamente utilizados por sus atractivas características físico-químicas. Por otra parte, cabe destacar el interés creciente que han recibido la preparación de bioconjugados, basados en la modificación de las nanopartículas por unión a moléculas biológicas, ya que en estos materiales híbridos pueden conjugarse las propiedades inherentes a las partículas metálicas con las de reconocimiento molecular propias de este tipo de moléculas [136]. Así, se han desarrollado procedimientos de síntesis de nanopartículas de tamaño y forma controlados que, además, pueden ser funcionalizadas fácilmente con biomoléculas como péptidos, enzimas, anticuerpos, ADN, etc. que presentan la ventaja de retener su actividad biológica, lo que no ocurre sobre otros materiales electródicos, como superficies metálicas pulidas, debido probablemente a la mayor libertad de orientación que poseen las biomoléculas inmovilizadas sobre las nanopartículas [137].

Como consecuencia de esto, son numerosos los sensores nanoestructurados encontrados en la bibliografía, donde se aprovechan las propiedades superficiales, electrónicas y catalíticas que ejercen las nanopartículas, disminuyendo el límite de detección de los analitos de interés, así como las mejoras que se presentan en cuanto a las características analíticas del sensor

[138]. A pesar de los grandes progresos en la síntesis de nanopartículas, aún se están diseñando nuevos procedimientos que permitan un mayor control del tamaño, forma y reactividad química de las nanopartículas preparadas, habida cuenta de sus numerosas aplicaciones en campos tan importantes como la obtención de los sensores microfluídicos, biosensores, catálisis y nanoelectroquímica [139].

En el presente trabajo de tesis se utilizaron nanopartículas de oro con la finalidad de aumentar la superficie electroactiva del electrodo de carbono vítreo, para luego ser funcionalizadas con polímeros específicos para la retención de parabenos.

1.3.2. Técnicas de caracterización

1.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido

Proporciona información sobre la morfología y topografía de la superficie de los sólidos. Para obtener una imagen por MEB de la superficie de un material, se focaliza sobre la muestra (de espesor suficiente para que sea opaca a los electrones) un haz de electrones acelerados por aplicación de un alto voltaje, realizando un barrido de la misma siguiendo una trayectoria de líneas paralelas. En microscopía electrónica se trabaja siempre al vacío para que la trayectoria de los electrones no sea desviada por la presencia de átomos o moléculas que no sean de la muestra a analizar. Para la caracterización de la superficie de los electrodos mediante esta técnica, es necesario que dicha superficie, una vez modificada, se encuentre totalmente seca, es decir, exenta de agua. Además, cuánto más conductora sea la superficie más fácilmente se obtendrán las micrografías. Si la muestra no es buena conductora se acostumbra a recubrirla con una película conductora metálica o de carbono para evitar que

ésta se cargue cuando sea irradiada. Finalmente, el electrodo se sitúa en el compartimento para muestras del microscopio y se obtienen las micrografías correspondientes.

1.3.2.2. Energía dispersiva de rayos X

Esta técnica se basa en la interacción de la materia con electrones incidentes de alta energía. Cuando el electrón incide sobre la muestra se produce la ionización de los átomos irradiados por el haz, al ser expulsados los electrones de las capas más interiores de los átomos. Cuando esto ocurre, se produce una transición electrónica, en la que los electrones de las capas más externas ocupan el lugar de aquellos con la consiguiente emisión de radiación electromagnética compuesta de rayos X y de luz visible. Esta radiación es característica para cada elemento, siendo de esta forma posible realizar análisis cualitativos y cuantitativos de las áreas del tamaño que deseemos en la superficie de las muestras.

1.3.2.3. Difracción de rayos X

Esta técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, sobre una muestra cristalina. Los mismos son difractados por los electrones que rodean los átomos por ser su longitud de onda del mismo orden de magnitud que el radio atómico. El haz de rayos X emergente tras esta interacción contiene información sobre la posición y tipo de átomos encontrados en su camino. Los cristales, gracias a su estructura periódica, dispersan elásticamente los haces de rayos X en ciertas direcciones y los amplifican por interferencia constructiva, originando un patrón de difracción.

Referencias Capítulo 1

- [1] C. N. Shaughnessy, D. Malajian, and D. V. Belsito, “Cutaneous delayed-type hypersensitivity in patients with atopic dermatitis: Reactivity to topical preservatives,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 70, no. 1, pp. 102–107, 2014.
- [2] F. A. Andersen, “Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products,” *Int. J. Toxicol.*, vol. 27, no. SUPPL. 4, pp. 1–82, 2008.
- [3] C.-H. Tan, S. Rasool, and G. A. Johnston, “Contact dermatitis: Allergic and irritant,” *Clin. Dermatol.*, vol. 32, no. 1, pp. 116–124, Jan. 2014.
- [4] “Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, chapter II, section 201.”
- [5] “Productos Cosméticos ANMAT.” Available: <https://www.argentina.gob.ar/productos-cosmeticos>.
- [6] M. Pauwels and V. Rogiers, “Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: A legally imposed challenge to science,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 243, no. 2, pp. 260–274, Mar. 2010.
- [7] A. E. Newburger, “Cosmeceuticals: myths and misconceptions,” *Clin. Dermatol.*, vol. 27, no. 5, pp. 446–452, Sep. 2009.
- [8] “Affair Manual on the scope of application of the Cosmetics Directive 76/768/EEC (art. 1(1) cosmetics directive), European Commission Consumer, 2009.”
- [9] “Disposición 2035/2012 de ANMAT: Listado de sustancias Conservantes Permitidas.” Available: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/abril_2012/Dispo_2035-12.pdf.

- [10] “Disposición 6365/2012 de ANMAT: Listado de sustancias que no deben contener los Productos de Higiene Personal, Cosméticos y Perfumes.”
- [11] “Disposición 6544/2012 de ANMAT: Listado de sustancias de uso limitado observadas a nivel nacional para Productos de Higiene Personal, Cosméticos y Perfumes.”
- [12] D. De Orsi *et al.*, “High performance liquid chromatography-diode array and electrospray-mass spectrometry analysis of vardenafil, sildenafil, tadalafil, testosterone and local anesthetics in cosmetic creams sold on the Internet web sites,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 50, no. 3, pp. 362–369, Oct. 2009.
- [13] M. C. Gaudiano *et al.*, “‘For export only’ medicines come back to Europe: A RP-LC method for the screening of six glucocorticoids in illegal and counterfeit anti-inflammatory and lightening creams,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 53, no. 2, pp. 158–164, Oct. 2010.
- [14] M. Pellegrini, E. Marchei, R. Pacifici, M. C. Rotolo, and S. Pichini, “Advances in the analysis of non-allowed pharmacologically active substances in cosmetic products,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 55, no. 4, pp. 842–847, Jun. 2011.
- [15] R. Porrà *et al.*, “Development of an HPLC method for the identification and dosage of non-allowed substances in cosmetic products. Part I: local anaesthetics and antihistaminics,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 380, no. 5–6, pp. 767–772, Nov. 2004.
- [16] F. F. Cantwell, “Pre-column reactions to eliminate interferents in the liquid chromatographic analysis of p-hydroxybenzoates in complex pharmaceuticals,” *Anal. Chem.*, vol. 48, no. 13, pp. 1854–1859, Nov. 1976.
- [17] N. Jonkers, A. Sousa, S. Galante-Oliveira, C. M. Barroso, H.-P. E. Kohler, and W. Giger, “Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de

- Aveiro, Portugal,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 17, no. 4, pp. 834–843, May 2010.
- [18] L. Núñez, J. L. Tadeo, A. I. García-Valcárcel, and E. Turiel, “Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1214, no. 1–2, pp. 178–182, Dec. 2008.
- [19] X. Liao, G. S. . Raghavan, and V.. Yaylayan, “A novel way to prepare n-butylparaben under microwave irradiation,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 43, no. 1, pp. 45–48, Jan. 2002.
- [20] Masten SA, “Review of Toxicological Literature,” 2005.
- [21] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, N. Negreira, and R. Cela, “Formation of halogenated by-products of parabens in chlorinated water,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 575, no. 1, pp. 106–113, Aug. 2006.
- [22] M. Terasaki and M. Makino, “Determination of chlorinated by-products of parabens in swimming pool water,” *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 88, no. 13, pp. 911–922, Nov. 2008.
- [23] M. A.- Bernier, A. I. Bernal-Ruiz, F. Rivas-Ruiz, M. T. Fernández-Morano, and M. de Troya-Martín, “Sensibilización de contacto a alérgenos de la serie estándar en el Hospital Costa del Sol: Estudio retrospectivo (2005-2010),” *Actas Dermosifiliogr.*, vol. 103, no. 3, pp. 223–228, Apr. 2012.
- [24] P. Guadarrama, S. Fomine, R. Salcedo, and A. Martínez, “Construction of simplified models to simulate estrogenic disruptions by esters of 4-hydroxy benzoic acid (parabens),” *Biophys. Chem.*, vol. 137, no. 1, pp. 1–6, Sep. 2008.
- [25] S. C. Rastogi, A. Schouten, N. de Kruijf, and J. W. Weijland, “Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products.,” *Contact Dermatitis*, vol. 32, no. 1, pp. 28–30, Jan. 1995.

- [26] M. G. Soni, I. G. Carabin, and G. A. Burdock, “Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens),” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 43, no. 7, pp. 985–1015, Jul. 2005.
- [27] M. Terasaki, Y. Takemura, and M. Makino, “Paraben-chlorinated derivatives in river waters,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 10, no. 4, pp. 401–406, Dec. 2012.
- [28] Liebert NA., “Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, and Butylparaben,” *J. Am. Coll. Toxicol.*, vol. 3, no. 5, pp. 147–209, Sep. 1984.
- [29] P. A. Pouillot A, Polla BS, “Conservateurs en cosmetology mise au point sur les parabenes.,” *J Méd Esthét Chir Dermatol*, vol. 33., p. 187–90., 2006.
- [30] “Directiva 76/768 / CEE.” [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=LEGISSUM%3A121191>. [Accessed: 09-Nov-2018].
- [31] de G. G. Kirchhof MG, “The health controversies of parabens.,” *Ski. Ther. Lett*, vol. 18, p. 5–7., 2013.
- [32] “Scientific Committee on Consumer Safety SCCS Clarification on Opinion SCCS/1348/10 in the light of the Danish clause of safeguard banning the use of parabens in cosmetic products intended for children under three years of age,” 2011.
- [33] Suresh, “Scientific Committee on Consumer Safety SCCS OPINION ON Parabens Updated request for a scientific opinion on propyl-and butylparaben COLIPA n° P82,” 2013.
- [34] E. J. Routledge, J. Parker, J. Odum, J. Ashby, and J. P. Sumpter, “Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 153, no. 1, pp. 12–19, Nov. 1998.
- [35] J. Boberg, C. Taxvig, S. Christiansen, and U. Hass, “Possible endocrine disrupting

- effects of parabens and their metabolites,” *Reprod. Toxicol.*, vol. 30, no. 2, pp. 301–312, Sep. 2010.
- [36] P. D. Darbre and P. W. Harvey, “Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 28, no. 5, pp. 561–578, Jul. 2008.
- [37] C. DeRosa, P. Richter, H. Pohl, and D. E. Jones, “Environmental exposures that affect the endocrine system: Public health implications,” *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B*, vol. 1, no. 1, pp. 3–26, Jan. 1998.
- [38] P. T. Harrison, “Endocrine disrupters and human health.,” *BMJ*, vol. 323, no. 7325, pp. 1317–8, Dec. 2001.
- [39] R. M. Sharpe and D. S. Irvine, “How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?,” *BMJ*, vol. 328, no. 7437, pp. 447–451, Feb. 2004.
- [40] S. Oishi, “Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats,” *Toxicol. Ind. Health*, vol. 17, no. 1, pp. 31–39, Feb. 2001.
- [41] S. Oishi, “Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice,” *Arch. Toxicol.*, vol. 76, no. 7, pp. 423–429, Jul. 2002.
- [42] S. Oishi, “Effects of propyl paraben on the male reproductive system.,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 40, no. 12, pp. 1807–13, Dec. 2002.
- [43] P. D. Darbre, A. Aljarrah, W. R. Miller, N. G. Coldham, M. J. Sauer, and G. S. Pope, “Concentrations of parabens in human breast tumours,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 24, no. 1, pp. 5–13, Jan. 2004.
- [44] P. W. Harvey and P. Darbre, “Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence

- in women?,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 24, no. 3, pp. 167–176, May 2004.
- [45] P. D. Darbre *et al.*, “Oestrogenic activity of benzylparaben,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 23, no. 1, pp. 43–51, Jan. 2003.
- [46] T. Okubo, Y. Yokoyama, K. Kano, and I. Kano, “ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 39, no. 12, pp. 1225–32, Dec. 2001.
- [47] P. S. Jones, D. Thigpen, J. L. Morrison, and A. P. Richardson, “p-Hydroxybenzoic Acid Esters as Preservatives III.:The Physiological Disposition of p-Hydroxybenzoic Acid and Its Esters,” *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.)*, vol. 45, no. 4, pp. 268–273, Apr. 1956.
- [48] W. G. Heim F, Leuschner F, “Metabolism of phydroxybenzoic acid ethyl ester,” *Klin. Wochenschr.*, vol. 35, pp. 823– 825, 1957.
- [49] T. S. Tsukamoto H, “Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbits,” *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 8, pp. 1066–1070, 1960.
- [50] R. DERACHE and J. GOURDON, “METABOLISM OF A FOOD PRESERVATIVE: PARAHYDROXYBENZOIC ACID AND ITS ESTERS.,” *Food Cosmet. Toxicol.*, vol. 1, pp. 189–95, Dec. 1963.
- [51] C. W. Whitworth and H. W. Jun, “Influence of Polysorbate 20 and Sodium Cholate on Uptake of p-Hydroxybenzoates by the Frog, *Rana pipiens*,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 62, no. 11, pp. 1890–1891, Nov. 1973.
- [52] S. Kitagawa, H. LI, and S. SATO, “Skin Permeation of Parabens in Excised Guinea Pig Dorsal Skin, Its Modification by Penetration Enhancers and Their Relationship with n-Octanol/Water Partition Coefficients.,” *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*., vol. 45, no. 8, pp. 1354–1357, 1997.

- [53] C. Lobemeier, C. Tschoetschel, S. Westie, and E. Heymann, “Hydrolysis of Parabenes by Extracts from Differing Layers of Human Skin,” *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, vol. 377, no. 10, pp. 647–652, Jan. 1996.
- [54] F. C., “Observations on the paper by Darbre et al. (2004),” *J Appl Toxicol.*, vol. 24., pp. 304–305, 2004.
- [55] G. Klopman and S. K. Chakravarti, “Screening of high production volume chemicals for estrogen receptor binding activity (II) by the MultiCASE expert system,” *Chemosphere*, vol. 51, no. 6, pp. 461–468, May 2003.
- [56] C. Lemini, R. Jaimez, M. E. Ávila, Y. Franco, F. Larrea, and A. E. Lemus, “In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens,” *Toxicol. Ind. Health*, vol. 19, no. 2–6, pp. 69–79, Mar. 2003.
- [57] Gregory A. Loraine* and M. E. Pettigrove†, “Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California,” 2005.
- [58] M. Valcárcel Cases, *Principios de química analítica*. Springer-Verlag Ibérica, 1999.
- [59] Z. Chen, G. Cao, and Q. Song, “Photo-polymerization of triclosan in aqueous solution induced by ultraviolet radiation,” *Environ. Chem. Lett.*, vol. 8, no. 1, pp. 33–37, Mar. 2010.
- [60] L. Figueiredo, G. L. Erny, L. Santos, and A. Alves, “Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review,” *Talanta*, vol. 146, pp. 754–765, Jan. 2016.
- [61] M. C. Pietrogrande and G. Basaglia, “GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 26, no. 11, pp. 1086–1094, Dec. 2007.

- [62] M. Nič, J. Jirát, B. Košata, A. Jenkins, and A. McNaught, Eds., *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.
- [63] M. R. Rifi and F.H. Covitz, *Introduction of Organic Electrochemistry*. 1974.
- [64] D. A. Skoog, F. J. Holler, and T. A. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*. 2000.
- [65] D. R. Kryscio and N. A. Peppas, “Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 2, pp. 461–473, Feb. 2012.
- [66] V. Pichon, “Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1152, no. 1–2, pp. 41–53, Jun. 2007.
- [67] M. N. Velasco-Garcia and T. Mottram, “Biosensor Technology addressing Agricultural Problems,” *Biosyst. Eng.*, vol. 84, no. 1, pp. 1–12, 2003.
- [68] P. Manesiotis, A. J. Hall, J. Courtois, K. Irgum, and B. Sellergren, “An Artificial Riboflavin Receptor Prepared by a Template Analogue Imprinting Strategy,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 44, no. 25, pp. 3902–3906, Jun. 2005.
- [69] A. Rachkov and N. Minoura, “Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach,” *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1544, no. 1–2, pp. 255–266, Jan. 2001.
- [70] F. L. Dickert* and O. Hayden, “Bioimprinting of Polymers and Sol–Gel Phases. Selective Detection of Yeasts with Imprinted Polymers,” 2002.
- [71] V. Chandrasekhar, *Inorganic and organometallic polymers*. Springer, 2005.
- [72] B. Sellergren, *Molecularly imprinted polymers : man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*. Elsevier, 2001.
- [73] A. Vicario, L. Aragón, C. C. Wang, F. Bertolino, and M. R. Gomez, “A simple and highly selective molecular imprinting polymer-based methodology for propylparaben

- monitoring in personal care products and industrial waste waters,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 149, pp. 225–233, Feb. 2018.
- [74] A. L. M. Ruela, E. C. de Figueiredo, F. C. Carvalho, M. B. de Araújo, and G. R. Pereira, “Adsorption and release of nicotine from imprinted particles synthesised by precipitation polymerisation: Optimising transdermal formulations,” *Eur. Polym. J.*, vol. 100, pp. 67–76, Mar. 2018.
- [75] R. Walsh, Q. Osmani, H. Hughes, P. Duggan, and P. McLoughlin, “Synthesis of imprinted beads by aqueous suspension polymerisation for chiral recognition of antihistamines,” *J. Chromatogr. B*, vol. 879, no. 30, pp. 3523–3530, Nov. 2011.
- [76] J. He *et al.*, “Preparation and characterization of molecularly imprinted microspheres for dibutyl phthalate recognition in aqueous environment,” *J. Sep. Sci.*, vol. 33, no. 21, pp. 3409–3414, Nov. 2010.
- [77] D. A. Wang B, Wang YZ, Yang H, Wang JQ, “Preparation and characterization of molecularly imprinted microspheres for selective extraction of trace melamine from milk samples..,” *Microchim. acta*, vol. 174, pp. 191–199, 2011.
- [78] J. Haginaka, H. Tabo, and H. Matsunaga, “Preparation of molecularly imprinted polymers for organophosphates and their application to the recognition of organophosphorus compounds and phosphopeptides,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 748, pp. 1–8, Oct. 2012.
- [79] Y. Hiratsuka, N. Funaya, H. Matsunaga, and J. Haginaka, “Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for bisphenol A and its analogues and their application to the assay of bisphenol A in river water,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 75, pp. 180–185, Mar. 2013.
- [80] X. Wang *et al.*, “Preparation of magnetic imprinted polymer particles via microwave

- heating initiated polymerization for selective enrichment of 2-amino-4-nitrophenol from aqueous solution," *Chem. Eng. J.*, vol. 178, pp. 85–92, Dec. 2011.
- [81] A. Vicario, M. Solari, E. Felici, L. Aragón, F. Bertolino, and M. R. Gomez, "Molecular imprinting on surface of silica particles for the selective extraction of benzylparaben in flow system applied to cosmetics and water samples," *Microchem. J.*, vol. 142, pp. 329–334, Nov. 2018.
- [82] Y. Yoshimi, Y. Yagisawa, R. Yamaguchi, and M. Seki, "Blood heparin sensor made from a paste electrode of graphite particles grafted with molecularly imprinted polymer," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 259, pp. 455–462, Apr. 2018.
- [83] G. Toth, B.; Horvai, "Chromatography, Solid-Phase Extraction, and Capillary Electrochromatography with MIPs.," *Mol. Imprinting*, vol. 325, pp. 267–306, 2012.
- [84] T. Pap, V. Horváth, A. Tolokán, G. Horvai, and B. Sellergren, "Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction," *J. Chromatogr. A*, vol. 973, no. 1–2, pp. 1–12, Oct. 2002.
- [85] X. Xiao, K. Yan, X. Xu, and G. Li, "Rapid analysis of ractopamine in pig tissues by dummy-template imprinted solid-phase extraction coupling with surface-enhanced Raman spectroscopy," *Talanta*, vol. 138, pp. 40–45, Jun. 2015.
- [86] H. G. Zuo *et al.*, "Preparation of malathion MIP-SPE and its application in environmental analysis," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 187, no. 7, p. 394, Jul. 2015.
- [87] A. M. Attaran, N. Mohammadi, M. Javanbakht, and B. Akbari-Adergani, "Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction for Selective Trace Analysis of Trifluoperazine," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 52, no. 7, pp. 730–738, Aug. 2014.
- [88] N. Martins *et al.*, "Design and development of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of deltamethrin in olive oil: An integrated computational-assisted

- approach,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1409, pp. 1–10, Aug. 2015.
- [89] A. M. Chrzanowska, A. Poliwoda, and P. P. Wieczorek, “Surface molecularly imprinted silica for selective solid-phase extraction of biochanin A, daidzein and genistein from urine samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1392, pp. 1–9, May 2015.
- [90] A. Beltran, R. M. Marcé, P. A. G. Cormack, and F. Borrull, “Synthetic approaches to parabens molecularly imprinted polymers and their applications to the solid-phase extraction of river water samples,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 677, no. 1, pp. 72–78, Sep. 2010.
- [91] Y.-P. Duan, C.-M. Dai, Y.-L. Zhang, and Ling-Chen, “Selective trace enrichment of acidic pharmaceuticals in real water and sediment samples based on solid-phase extraction using multi-templates molecularly imprinted polymers,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 758, pp. 93–100, Jan. 2013.
- [92] A. H. El-Sheikh, R. W. Al-Quse, M. I. El-Barghouthi, and F. S. Al-Masri, “Derivatization of 2-chlorophenol with 4-amino-anti-pyrine: A novel method for improving the selectivity of molecularly imprinted solid phase extraction of 2-chlorophenol from water,” *Talanta*, vol. 83, no. 2, pp. 667–673, Dec. 2010.
- [93] X. Wang, L. Chen, X. Xu, and Y. Li, “Synthesis of molecularly imprinted polymers via ring-opening metathesis polymerization for solid-phase extraction of bisphenol A.,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 401, no. 4, pp. 1423–32, Sep. 2011.
- [94] I. Basozabal *et al.*, “Rational design and chromatographic evaluation of histamine imprinted polymers optimised for solid-phase extraction of wine samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1308, pp. 45–51, Sep. 2013.
- [95] J. Cao, S. Zhou, W. Kong, M. Yang, L. Wan, and S. Yang, “Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of ochratoxin A in ginger and LC-

- MS/MS confirmation,” *Food Control*, vol. 33, no. 2, pp. 337–343, Oct. 2013.
- [96] L. A. de Barros, I. Martins, and S. Rath, “A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 3, pp. 1355–1361, Jun. 2010.
- [97] S. Ambrosini, S. Shinde, E. De Lorenzi, and B. Sellergren, “Glucuronide directed molecularly imprinted solid-phase extraction: isolation of testosterone glucuronide from its parent drug in urine,” *Analyst*, vol. 137, no. 1, pp. 249–254, Nov. 2012.
- [98] J. Song, X. Qiao, H. Chen, D. Zhao, Y. Zhang, and Z. Xu, “Molecularly imprinted solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography for analysis of trace olaquindox residues in chick feeds,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 91, no. 13, pp. 2378–2385, Oct. 2011.
- [99] N. Gilart, R. M. Marcé, N. Fontanals, and F. Borrull, “A rapid determination of acidic pharmaceuticals in environmental waters by molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to tandem mass spectrometry without chromatography,” *Talanta*, vol. 110, pp. 196–201, Jun. 2013.
- [100] X. Shi, J. Liu, A. Sun, D. Li, and J. Chen, “Group-selective enrichment and determination of pyrethroid insecticides in aquaculture seawater via molecularly imprinted solid phase extraction coupled with gas chromatography-electron capture detection,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1227, pp. 60–66, Mar. 2012.
- [101] X. Sun *et al.*, “Highly class-selective solid-phase extraction of bisphenols in milk, sediment and human urine samples using well-designed dummy molecularly imprinted polymers,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1360, pp. 9–16, Sep. 2014.
- [102] Y.-T. Wu *et al.*, “Selective and simultaneous determination of trace bisphenol A and tebuconazole in vegetable and juice samples by membrane-based molecularly

- imprinted solid-phase extraction and HPLC.,” *Food Chem.*, vol. 164, pp. 527–35, Dec. 2014.
- [103] T. Kubo *et al.*, “Effective determination of a pharmaceutical, sulpiride, in river water by online SPE-LC–MS using a molecularly imprinted polymer as a preconcentration medium,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 89, pp. 111–117, Feb. 2014.
- [104] C. Zhao, T. Zhao, X. Liu, and H. Zhang, “A novel molecularly imprinted polymer for simultaneous extraction and determination of sudan dyes by on-line solid phase extraction and high performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 45, pp. 6995–7002, Nov. 2010.
- [105] Z.-J. Duan, L.-P. Fan, G.-Z. Fang, J.-H. Yi, and S. Wang, “Novel surface molecularly imprinted sol–gel polymer applied to the online solid phase extraction of methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid and quinoxaline-2-carboxylic acid from pork muscle,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 401, no. 7, pp. 2291–2299, Oct. 2011.
- [106] M. Pourfarzib, R. Dinarvand, B. Akbari-adergani, A. Mehramizi, H. Rastegar, and M. Shekarchi, “Water-compatible molecularly imprinted polymer as a sorbent for the selective extraction and purification of adefovir from human serum and urine,” *J. Sep. Sci.*, vol. 38, no. 10, pp. 1755–1762, May 2015.
- [107] X. Wang, X. Qiao, Y. Ma, T. Zhao, and Z. Xu, “Simultaneous Determination of Nine Trace Organophosphorous Pesticide Residues in Fruit Samples Using Molecularly Imprinted Matrix Solid-Phase Dispersion Followed by Gas Chromatography,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 16, pp. 3821–3827, Apr. 2013.
- [108] H. Zhang *et al.*, “Preparation and Application of a Molecular Imprinting Matrix Solid Phase Dispersion Extraction for the Determination of Olaquindox in Chicken by High Performance Liquid Chromatography,” *Food Anal. Methods*, vol. 6, no. 3, pp. 915–

921, Jun. 2013.

- [109] F. Qiao and H. Sun, “Simultaneous extraction of enrofloxacin and ciprofloxacin from chicken tissue by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 53, no. 3, pp. 795–798, Nov. 2010.
- [110] M. Contin, S. Flor, M. Martinefski, S. Lucangioli, and V. Tripodi, “The use of coenzyme Q0 as a template in the development of a molecularly imprinted polymer for the selective recognition of coenzyme Q10,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 807, pp. 67–74, Jan. 2014.
- [111] J. Xin, X. Qiao, Y. Ma, and Z. Xu, “Simultaneous separation and determination of eight organophosphorous pesticide residues in vegetables through molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to gas chromatography,” *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 24, pp. 3501–3508, Dec. 2012.
- [112] B. Claude, R. Nehmé, and P. Morin, “Analysis of urinary neurotransmitters by capillary electrophoresis: Sensitivity enhancement using field-amplified sample injection and molecular imprinted polymer solid phase extraction,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 699, no. 2, pp. 242–248, Aug. 2011.
- [113] S. Lucangioli *et al.*, “A capillary electrophoretic system based on a novel microemulsion for the analysis of coenzyme Q10 in human plasma by electrokinetic chromatography,” *Electrophoresis*, vol. 30, no. 11, pp. 1899–1905, Jun. 2009.
- [114] M. Soleimani, S. Ghaderi, M. G. Afshar, and S. Soleimani, “Synthesis of molecularly imprinted polymer as a sorbent for solid phase extraction of bovine albumin from whey, milk, urine and serum,” *Microchem. J.*, vol. 100, pp. 1–7, Jan. 2012.
- [115] M. Jia, L. Qin, X.-W. He, and W.-Y. Li, “Preparation and application of lysozyme imprinted monolithic column with dopamine as the functional monomer,” *J. Mater.*

- Chem.*, vol. 22, no. 2, pp. 707–713, Dec. 2012.
- [116] S. A. Zaidi, “Dual-templates molecularly imprinted monolithic columns for the evaluation of serotonin and histamine in CEC,” *Electrophoresis*, vol. 34, no. 9–10, pp. 1375–1382, May 2013.
- [117] Z. Zhang, R. Wu, M. Wu, and H. Zou, “Recent progress of chiral monolithic stationary phases in CEC and capillary LC,” *Electrophoresis*, vol. 31, no. 9, pp. 1457–1466, May 2010.
- [118] Z. Z. Huangfu FY, Wang B, Shan JJ, “Enantioselective analysis of naproxen using chiral molecular imprinting polymers based thin-layer chromatography.,” *E-Polymers*, 2013.
- [119] D. Wistuba and V. Schurig, “Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography.,” *J. Chromatogr. A*, vol. 875, no. 1–2, pp. 255–76, Apr. 2000.
- [120] L. I. Andersson, C. F. Mandenius, and K. Mosbach, “Studies on guest selective molecular recognition on an octadecyl silylated silicon surface using ellipsometry,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 29, no. 42, pp. 5437–5440, 1988.
- [121] S. Suriyanarayanan, P. J. Cywinski, A. J. Moro, G. J. Mohr, and W. Kutner, “Chemosensors Based on Molecularly Imprinted Polymers,” in *Topics in current chemistry*, vol. 325, 2010, pp. 165–265.
- [122] P. S. Sharma, M. Dabrowski, F. D’Souza, and W. Kutner, “Surface development of molecularly imprinted polymer films to enhance sensing signals,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 51, pp. 146–157, Nov. 2013.
- [123] P. S. Sharma, Z. Iskierko, A. Pietrzyk-Le, F. D’Souza, and W. Kutner, “Bioinspired intelligent molecularly imprinted polymers for chemosensing: A mini review,”

- Electrochim. commun.*, vol. 50, pp. 81–87, Jan. 2015.
- [124] L. Uzun and A. P. F. Turner, “Molecularly-imprinted polymer sensors: realising their potential,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 76, pp. 131–144, Feb. 2016.
- [125] E. Hedborg, F. Winquist, I. Lundström, L. I. Andersson, and K. Mosbach, “Some studies of molecularly-imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices,” *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 37–38, pp. 796–799, Jun. 1993.
- [126] P. S. Sharma, A. Pietrzyk-Le, F. D’Souza, and W. Kutner, “Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, no. 10, pp. 3177–3204, Apr. 2012.
- [127] C. . Allender, C. Richardson, B. Woodhouse, C. . Heard, and K. . Brain, “Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers,” *Int. J. Pharm.*, vol. 195, no. 1–2, pp. 39–43, Feb. 2000.
- [128] S. Shinkai and M. Takeuchi, “Molecular design of synthetic receptors with dynamic, imprinting, and allosteric functions,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 6, pp. 1250–1259, Dec. 2004.
- [129] B. Sellergren and C. J. Allender, “Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 12, pp. 1733–1741, 2005.
- [130] X. Zhu, A. Heine, F. Monnat, K. N. Houk, K. D. Janda, and I. A. Wilson, “Structural basis for antibody catalysis of a cationic cyclization reaction.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 329, no. 1, pp. 69–83, May 2003.
- [131] G. Wulff*, “Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers,” vol. 102, pp. 1–28, 2002.
- [132] K. Morihara, S. Kurihara, and J. Suzuki, “Footprint Catalysis. I. A New Method for Designing ‘Tailor-Made’ Catalysts with Substrate Specificity: Silica (Alumina)

- Catalysts for Butanolysis of Benzoic Anhydride," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 61, no. 11, pp. 3991–3998, Nov. 1988.
- [133] A. Katz and M. E. Davis, "Molecular imprinting of bulk, microporous silica," *Nature*, vol. 403, no. 6767, pp. 286–289, Jan. 2000.
- [134] † Huiqi Zhang, † Theeraphon Piacham, ‡ Mark Drew, ‡ Marcel Patek, *,† and Klaus Mosbach, and † Lei Ye*, "Molecularly Imprinted Nanoreactors for Regioselective Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction," 2006.
- [135] J. J. B. and and M. R. Gagné*, "Exploiting the Synergy between Coordination Chemistry and Molecular Imprinting in the Quest for New Catalysts," 2004.
- [136] M. L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, and J. M. Pingarrón, "A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes," *Anal. Biochem.*, vol. 336, no. 1, pp. 20–27, Jan. 2005.
- [137] J. Liu and Y. Lu, "Colorimetric Biosensors Based on DNAzyme-Assembled Gold Nanoparticles," *J. Fluoresc.*, vol. 14, no. 4, pp. 343–354, Jul. 2004.
- [138] L. Cai, H. Tabata, and T. Kawai, "Probing electrical properties of oriented DNA by conducting atomic force microscopy," *Nanotechnology*, vol. 12, no. 3, pp. 211–216, Sep. 2001.
- [139] P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón, "Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 382, no. 4, pp. 884–886, Jun. 2005.

CAPÍTULO 2

REACTIVOS, MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos y Soluciones

2.1.1 Metilparabeno, Propilparabeno, Bencilparabeno

MP (metil 4-hidroxibenzoato), PP (propil 4-hidroxibenzoato) y BeP (bencil 4-hidroxibenzoato) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La solución madre de $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$ de cada uno de los estándares, fue preparada pesando 2,00 mg de la droga y llevando a un volumen final de 10,00 mL en un matraz aforado con etanol. Para preparar la solución de trabajo se tomó una cantidad perfectamente medida de la solución madre y se la diluye con una mezcla etanol: agua 2:8 (v/v), hasta obtener la concentración requerida para cada ensayo. Todas las soluciones se almacenaron a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

2.1.2 Butilparabeno

BuP (butil 4-hidroxibenzoato) fue adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Se prepararon dos soluciones madre de $5,80 \text{ mg mL}^{-1}$ ($0,03 \text{ mol L}^{-1}$) pesando 58 mg de la droga y llevando a un volumen final de 10,00 mL en un matraz aforado con etanol y otro con etoxietanol. Para preparar la solución de trabajo se tomó una cantidad perfectamente medida de la solución madre y se la diluye con una mezcla etanol: agua 2:8 (v/v), hasta obtener la concentración requerida para cada ensayo. Todas las soluciones se almacenaron a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

2.1.3 Ácido benzoico

Ácido benzoico fue adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La solución madre de 0,20 mg mL⁻¹ fue preparada pesando 2,00 mg de la droga y llevando a un volumen final de 10,00 mL en un matraz aforado con etanol. Para preparar la solución de trabajo se tomó una cantidad perfectamente medida de la solución madre y se la diluye con una mezcla etanol: agua 2:8 (v/v), hasta obtener la concentración requerida para cada ensayo. Todas las soluciones se almacenaron a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

2.1.4 Reactivos de síntesis para MISPE y MIS

Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), ácido metacrílico (MAA) y peróxido de benzoilo (BPO), se utilizaron para la síntesis de los MIP/NIP para SPE. En el caso de la síntesis de los MIS/NIS se utilizaron los siguientes reactivos: 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (3-MPTS), tetraetoxisilano (TEOS), feniltrietoxisilano (PTEOS), 3-aminopropil trimetoxisilano (3-APTMS) y etoxietanol. Todos los reactivos fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.1.5 Síntesis de nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) se sintetizaron partiendo de una solución del precursor químico, el ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) al 0,01% contenido KCl 0,1 mol L⁻¹ como electrolito soporte (preparado en agua bidestilada y desgasificado por burbujeo con nitrógeno). Los reactivos fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Posteriormente, se sumergió el electrodo de trabajo de carbono vítreo (GCE) y se aplicó un

potencial constante de -200 mV vs Ag/AgCl, NaCl (3 mol L⁻¹) durante 60 segundos. Finalmente, el electrodo modificado (AuNPs/GCE) se lavó por agitación mecánica a 250 rpm durante 30 segundos con agua bidestilada y se secó cuidadosamente con gas de nitrógeno puro.

2.1.6 Cartuchos para SPE

Cartuchos comerciales para SPE fueron utilizados con el fin de comparar la performance del MIP. Columnas de SPE de Silica y C-18 (Enviro Clean®) y Silica Gel G (Type 60) fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany).

2.1.7 Solventes empleados para HPLC

Solventes como etanol, propanol, acetonitrilo, n-hexano, ácido acético y tolueno fueron de grado analítico mientras que metanol fue de grado HPLC. Todos ellos fueron suministrados por Sintorgan (Buenos Aires, Argentina).

2.1.8 Soluciones reguladoras de pH

Soluciones de NaOH, HCl, HClO₄ y HNO₃ (Merck, Darmstadt, Germany) se emplearon para obtener los valores de pH requeridos para cada ensayo.

Asimismo se empleó como buffer para el análisis cromatográfico una solución de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄ 6,80 g L⁻¹). Los valores de pH requeridos se lograron mediante el agregado de soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, empleando un pH-metro.

Para el análisis electroquímico se utilizó como electrolito soporte una solución de H₂SO₄ 1,00 mol L⁻¹ pH 2,5, buffer acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 10,0 y 2,00 y soluciones de PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 10,0 y 7,00.

2.2 Equipamiento utilizado

2.2.1 HPLC y UHPLC

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo utilizando un equipo Gilson HPLC (Esanco, Argentina) equipado con un controlador de bomba Gilson 322, un inyector Rheodyne con un *loop* de 20 μL , un detector UV-Vis de arreglo de diodos Gilson 170 (Buenos Aires, Argentina). La columna de separación utilizada fue una Phenomenex Gemini 5 μm C18 110 \AA (150 \times 4,6 mm) (Buenos Aires, Argentina).

También se utilizó un Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series equipado con inyector automático, sistema de separación cuaternario bomba y detector de arreglo de diodos DAD-3000 (RS). Se empleó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm; 5 μm ; Agilent) para todos los análisis cromatográficos.

2.2.2 Estación de trabajo electroquímico

Todas las medidas electroquímicas fueron realizadas con la estación de trabajo BAS 100 B/W (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA), conectada a una computadora personal para el control remoto de la misma. Además, se utilizó la plataforma para celdas BAS C-3, la que se acopló a la estación de trabajo.

2.2.2.1 Electrodos

El electrodo de trabajo, consiste en un cuerpo plástico de CTFE resistente a los solventes (7,5 cm longitud y 6 mm diámetro externo), el que posee en uno de sus extremos un disco

perfectamente pulido de carbono vítreo (GC) de sus siglas en inglés *glassy carbon* de 3,0 mm de diámetro (BAS MF-2012).

El contraelectrodo, es un alambre de Pt de 0,5 mm de diámetro y de longitud variable. El alambre de Pt es conectado a un terminal de bronce por medio de un conector de oro.

Como electrodo de referencia, conectado por el cable blanco, se utiliza un electrodo de Ag/AgCl, NaCl (3 mol L⁻¹) (BAS MF-2052).

2.2.3 Espectrofotómetro

Para realizar los análisis espectrofotométricos se empleó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 con lámpara de deuterio y tungsteno, y celda de vidrio o cuarzo de 1 cm de paso óptico.

2.2.4 Análisis por inyección en flujo

En el análisis en flujo, las soluciones fueron propulsadas por una bomba peristáltica (Wilson Minipuls 3) a través de tuberías de PVC de diámetro interno 0,8 mm. Se empleó una válvula Rheodyne de dos posiciones con 6 puertos.

2.2.5 Espectroscopia IR

La espectroscopía infrarroja de reflectancia difusa (DRIFTS) para el análisis de sorbentes sintetizados se realizó utilizando un espectrofotómetro infrarrojo Shimadzu por transformada de Fourier (IRAffinity⁻¹). Los espectros se recogieron en el rangopectral de 2500 a 500 cm⁻¹, con una resoluciónpectral de 2 cm⁻¹.

2.2.6 ÁREA BET (Brunauer -Emmett-Teller)

La caracterización textural de las muestras en estudio se llevó a cabo mediante adsorción-desorción de N₂ a 77 K con un equipo de adsorción manométrica Autosorb 1-MP (EE. UU.)

2.2.7 Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se obtuvieron con un equipo LEO 1450VP (presión variable).

2.2.8 pH-metro

Para las medidas de pH, se empleó un pH-metro Orion Expandable Ion Analyzer Modelo EA940 (Orion Research, Cambridge, MA, USA) con electrodo combinado de vidrio y un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

2.2.9 Centrífuga

La centrifugación se realizó mediante una centrífuga Beckman TJ-6 (Buenos Aires, Argentina).

2.2.10 Vortex

Las soluciones fueron mezcladas en un vortex “DLAB” MX-S.

2.2.11 Shaker

Para agitar y homogeneizar las soluciones utilizadas se utilizó un Shaker Orbital “LAB-LINE” modelo N° 3521.

2.2.12 Balanza

Para realizar las pesadas de los reactivos utilizados en la preparación de las soluciones patrones se usó una balanza analítica monoplato, con una precisión de hasta 10^{-5} g, marca Sartorius.

2.3. Procedimientos

2.3.1. Síntesis de MIPs para la monitorización de propilparabeno en productos de cuidado personal y efluentes.

2.3.1.1. Síntesis del polímero

Para la síntesis del MIP utilizado en las experiencias posteriores, se seleccionó la técnica de polimerización en bloque, siguiendo un enfoque no covalente. Para este primer ensayo, se utilizó como molécula plantilla el PP. En primer lugar, se disolvió el monómero funcional MAA y PP en tolueno (porógeno), la solución de pre-polimerización obtenida se dejó incubar por 1 hora, y luego se adicionó el entrecruzante (EGDMA) y el iniciador radicalario (BPO). La mezcla fue purgada con nitrógeno por 2 minutos, cerrando el vial inmediatamente.

Con el objetivo de iniciar el proceso de polimerización, la mezcla recientemente obtenida fue introducida en un baño de glicerina a 60 °C por 24 horas. Una vez completada la síntesis del MIP, se prosiguió a la remoción de la plantilla, para lo cual se colocó el polímero en un tubo de polipropileno, se adicionó una mezcla de metanol/ácido acético (9:1, v/v) y se agitó en un vortex, luego el sobrenadante fue separado por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos. Esta operación fue repetida ocho veces, hasta no detectar la plantilla en el sobrenadante por HPLC-DAD.

Como control un NIP (polímero no impreso) fue simultáneamente sintetizado bajo las mismas condiciones pero en ausencia de PP (molécula plantilla).

2.3.1.2. Preparación de la muestra

La muestra analítica consistió en tres marcas de toallitas usadas para la higiene de bebés (2 que contenían PP y 1 "libre de PAs"), toallitas antibacterianas (sin PP indicado en su composición) y aguas residuales industriales con y sin la adición de un estándar de PP.

Para todos los experimentos se utilizó como muestra analítica 3 toallitas de las diferentes marcas, las cuales se colocaron en un vaso de precipitado con 20,00 mL de agua MilliQ y se llevó a ebullición durante 1 minuto. El líquido resultante se filtró y el procedimiento se repitió para asegurarnos de extraer de manera cuantitativa el PP presente en la muestra.

Las dos alícuotas se combinaron y se llevaron a 50,00 mL con agua MilliQ, y luego se tomaron 8,00 mL de esta solución y se diluyeron a un volumen final de 10,00 mL con etanol.

Las muestras de efluentes se recolectaron de un área industrial, se homogeneizaron, se tomaron dos alícuotas de 8,00 mL y se diluyeron a un volumen final de 10,00 mL con etanol.

A una de las muestras de efluente se añadió 1,00 mL de un estándar de PP.

2.3.1.3. Ensayos de interacción MIP-PP

Para obtener la máxima adsorción de la molécula de interés, la cantidad de polímero a utilizar, el tiempo necesario y demás parámetros que influyen en la interacción, se evaluaron en un estudio en *batch*. El efecto de la cantidad de polímero en la unión de PP-MIP se estudió dentro del intervalo de 5,00-30,00 mg. El tiempo de interacción se investigó de 1 a 45 minutos. Para evaluar la influencia de los disolventes de interacción sobre las propiedades de reconocimiento de MIP se utilizaron los siguientes medios: agua, acetonitrilo, metanol, etanol, propanol, n-hexano, tolueno y sus mezclas en diferentes proporciones. La influencia

del pH de la muestra sobre la interacción se evaluó dentro del rango 5,0-9,0. Para evaluar los parámetros anteriormente mencionados se preparó una solución de PP estándar diluyendo el analito en una mezcla de etanol/agua en una proporción de 2:8 para obtener una concentración final de $0,020 \text{ mg mL}^{-1}$. Para el estudio de pH, el agua fue reemplazada por soluciones de *buffer* fosfato dentro de un rango de pH de 5,0-9,0.

Con la finalidad de evaluar el tiempo de interacción, 1,00 mL de estándar de PP se agregó a una cantidad apropiada de sorbente en un tubo *eppendorf* de polipropileno. La mezcla se agitó en vortex por 2 minutos y luego en *shaker* por periodos de tiempo de 1 hasta 45 minutos. Después de eso, el sobrenadante se separó por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos y se analizó por HPLC-DAD. Para el estudio de interferencia, una mezcla de soluciones estándar de PP y MP (1:1) se puso en contacto con el polímero como se describió anteriormente.

Después de optimizar el procedimiento de unión, se colocaron 20,00 mg del polímero sintetizado dentro de una jeringa de polipropileno (3,00 mL) entre dos capas de lana de vidrio de 2 mm de ancho cada una. El proceso de extracción para cada alícuota de muestra de 5,00 mL se llevó a cabo aplicando vacío en el extremo inferior de la columna. La velocidad de flujo aplicada fue de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$. Una vez que el analito se adsorbió sobre el MIP, el sorbente se lavó usando 2,00 mL de agua ultrapura para eliminar las sustancias no adsorbidas. Con el fin de comparar los resultados, el estudio también se llevó a cabo en dos cartuchos utilizados comúnmente para SPE (sílica y C18).

2.3.1.4. Ensayos de elución

Después del estudio de adsorción descrito previamente, se estudió en un sistema en *batch* la influencia de la naturaleza y el volumen del disolvente en la desorción del analito. Con este objetivo, diferentes mezclas de etanol/agua y volúmenes dentro del rango de 0,20-5,00 mL se pusieron en contacto con el MIP-PP. Los tubos que contenían los diferentes solvente de elución en contacto con el MIP-PP, se agitaron en un vórtice durante 1 minuto y se centrifugaron luego a 5000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante exento de partículas se inyectó en un equipo de HPLC-DAD para la cuantificación de PP. Para propósitos de control, se aplicó el mismo procedimiento al complejo NIP-PP. Considerando los resultados obtenidos en el estudio de desorción en batch, se investigó la elución del analito empleando 1,00 mL de mezcla de etanol/agua 8:2 (v/v) a un flujo de 1,00 mL min⁻¹. El eluato se filtró antes de su inyección en el sistema de HPLC para análisis.

2.3.1.5. Análisis de muestras por HPLC-DAD

Para la monitorización de PP tanto en sobrenadantes como en eluatos, se tomó 1,00 mL de cada alícuota y fue analizado mediante HPLC-DAD. Las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0,45 µm (26 mm de diámetro) antes de la inyección en el sistema cromatográfico. Se inyectaron 20 µL de muestra y se las analizó utilizando un modo isocrático, como fase móvil se empleó una solución compuesta por 65% de metanol y 35% de buffer fosfato monobásico (KH_2PO_4 6,8 g L⁻¹). El análisis se realizó a un flujo constante de 1,00 mL min⁻¹, y el analito fue monitoreado a 227 nm. El tiempo de retención fue de aproximadamente 4,52 minutos. El PP adsorbido a MIP/NIP se calculó restando el analito no

unido a la concentración inicial del analito. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a menos que se mencione lo contrario.

2.3.1.6. Validación

La validación analítica de esta metodología se realizó de acuerdo con las directrices internacionales de la ICH (Conferencia Internacional sobre Armonización). Las muestras de toallitas comerciales utilizadas para la higiene de bebés, libres de PAs, sirvieron como referencia durante la validación del método analítico propuesto. La evaluación de la linealidad de la metodología MISPE-HPLC-DAD se llevó a cabo con muestras PCP “libres de PAs” enriquecidas con soluciones estándar de PP con concentraciones que variaron de 24 a 500 ng mL⁻¹. El procedimiento fue desarrollado utilizando muestras enriquecidas por triplicado a seis niveles de concentración y las áreas de los picos obtenidos se usaron para realizar las curvas de calibración. Las ecuaciones de calibración se obtuvieron mediante el método de regresión lineal de mínimos cuadrados y se usaron para el cálculo de concentraciones desconocidas.

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad de todo el procedimiento analítico se evaluó aplicando la metodología a 2 alícuotas de PCP “libres de PAs” enriquecidas con PP y analizadas por HPLC-DAD por triplicado en el mismo día. Para la evaluación de la precisión intermedia, se varió, el día de operación, el operador y los reactivos o electrolitos. Por lo tanto, todo el procedimiento analítico se realizó durante tres días consecutivos utilizando una muestra “libre de PAs” con el agregado de PP estándar

Para investigar la capacidad de reutilización de los polímeros sintetizados, se realizaron 5 ciclos de adsorción-desorción por día.

La exactitud se evaluó en términos de porcentaje de recuperación, mediante la aplicación del método propuesto a una muestra de PCP “libre de PAs” enriquecida con cantidades conocidas de soluciones de PP a seis niveles de concentración ($n=6$). El estudio se realizó como se describió previamente y los líquidos de elución se analizaron por HPLC-DAD por triplicado.

2.3.2. Modificación de partículas de sílica para la extracción de bencilparabeno.

Automatización de muestreo

2.3.2.1. Preparación de las partículas de sílice impresas (Si-MIP)

Para la síntesis de partículas de sílica cubiertas con polímeros de impresión molecular (Si-MIP), se utilizó como molécula molde BeP. Se seleccionó el MAA como monómero funcional, y tolueno como porógeno, EGDMA como agente de entrecruzamiento y BPO como iniciador. El MIP se imprimió sobre partículas de sílica gel que se usaron como soporte inerte. Simultáneamente, para propósitos de comparación, se sintetizó un NIP sobre las partículas de sílica (Si-NIP) y un MIP sin soporte. Los Si-MIP se prepararon mediante polimerización en masa de acuerdo con el enfoque no covalente, disolviendo la molécula plantilla y el monómero funcional en tolueno. La mezcla de pre-polimerización se incubó durante 1 hora, y después de esto, se añadieron el agente de reticulación, el iniciador y la sílica gel. La mezcla se purgó con nitrógeno durante 2 minutos y se colocó en un baño de glicerina a 60 °C durante 2 y 4 horas para inducir la polimerización. Después de esto, se retiró el sobrenadante, y el polímero se extendió sobre un vidrio de reloj y se dejó secar. La eliminación de la plantilla se llevó a cabo con una mezcla de metanol:ácido acético (9:1, v/v) agitando la solución en un vortex y luego, el sobrenadante se separó por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos. Esta operación se repitió ocho veces hasta que la plantilla no se detectó por HPLC-DAD en el sobrenadante de Si-MIP (2 y 4 horas), Si-NIP (2 y 4 horas) y MIP.

2.3.2.2. Descripción de las muestras y tratamiento

Se seleccionaron dos muestras para monitorizar BeP. Una consistió en una muestra de agua recolectada de una piscina local; la segunda muestra a analizar fue un protector solar semisólido que no declaraba contener en su composición BeP. Para el análisis de la muestra de agua de la piscina, se tomaron seis alícuotas de 10,00 mL, se filtraron y se almacenaron a 5 °C hasta el ensayo. En el caso del protector solar, se pesaron seis alícuotas de 1,0 g y se añadieron 25,00 mL de agua. Las muestras se calentaron durante 10 minutos y luego se llevaron a un volumen final de 50,00 mL, se centrifugaron y 10,00 mL del sobrenadante se filtró a través de filtros de membrana de nylon de 0,45 µm (26 mm de diámetro). Las soluciones filtradas se recogieron para una etapa de preconcentración adicional.

2.3.2.3. Evaluación de unión y desorción en *batch*.

Con el fin de obtener la máxima adsorción de la molécula molde, se evaluó a través de un estudio en *batch*, la cantidad de material Si-MIP utilizado y el tiempo de unión. El efecto de la cantidad de Si-MIP en la unión a BeP se evaluó dentro del intervalo de 10,00 a 40,00 mg. El tiempo de interacción se investigó de 1 a 25 minutos. La influencia del pH de la muestra en el proceso de interacción se evaluó dentro de un rango de pH previamente establecido (5,0-9,0). Los resultados obtenidos de Si-MIP se compararon con Si-NIP y MIP. Para el estudio de pH, el agua fue reemplazada por soluciones de *buffer* de fosfato dentro de un rango de pH de 5,0-9,0. El procedimiento de unión fue el siguiente: se añadió 1,00 mL de estándar a una cantidad apropiada de sorbente en un tubo *eppendorf* de polipropileno. La mezcla se sometió a agitación a 1500 rpm durante 2 minutos y luego se agitó a 120 rpm a temperatura ambiente para cada tiempo de unión estudiado. Después de eso, el sobrenadante se separó por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos y se analizó por HPLC-DAD. Para el

estudio de interferencia, se agregó una mezcla de soluciones estándar de MP y PP al estándar BeP.

Por otro lado, se estudió la influencia de la naturaleza y el volumen del disolvente de elución seleccionado para la desorción del analito. Para este propósito, diferentes mezclas de etanol/agua y volúmenes dentro del rango de 0,20-5,00 mL fueron puestos en contacto con el complejo Si-MIP/BeP. Luego se agitó en un vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes filtrados se inyectaron en el HPLC para la cuantificación de BeP. El mismo procedimiento se aplicó a Si-MIP (2 y 4 horas), Si-NIP (2 y 4 horas) y MIP.

2.3.2.4. Estudios de SPE automatizada. Preconcentración.

La SPE automatizada se llevó a cabo utilizando una columna de preconcentración casera que consistía en 25,00 mg del Si-MIP sintetizado envasado dentro de una jeringa de polipropileno (1,00 mL). El MIP se colocó entre dos capas de lana de vidrio de 2 mm de ancho cada una. Para el paso de adsorción del analito, la válvula se colocó en la posición 1. En esta posición, 10,00 mL de soluciones de muestra filtradas fueron impulsadas por una bomba peristáltica y fluyeron a través de la columna hasta el desecho (velocidad de flujo 1,00 mL min⁻¹). A continuación, la eliminación de posibles interferencias se realizó con 2,00 mL de agua ultrapura y, posteriormente, la posición de la válvula se estableció en 2 para la desorción de BeP con 0,50 mL del eluyente. El eluato recogido se analizó luego mediante un sistema de UHPLC-DAD (Figura 2.1).

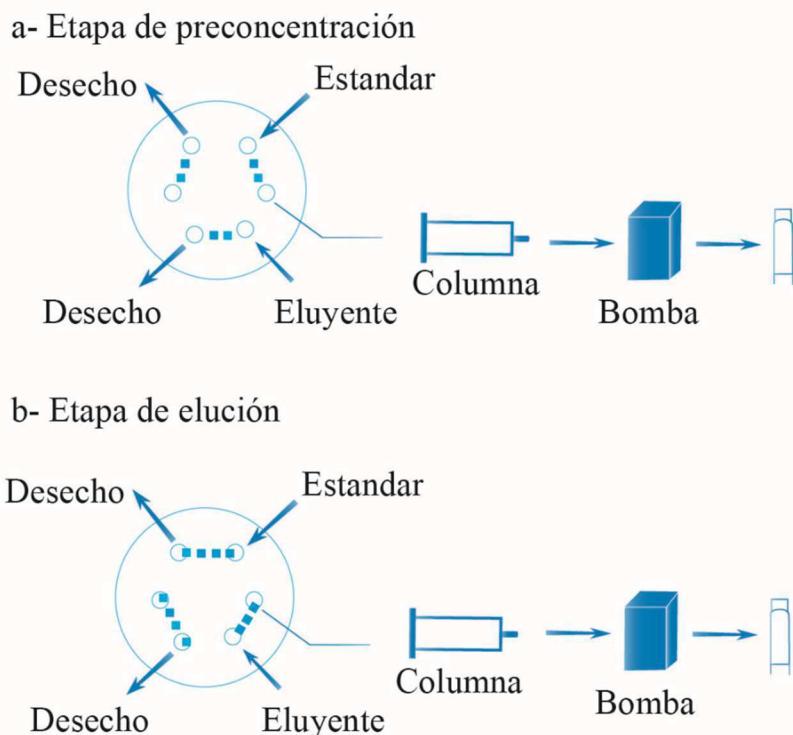


Figura 2.1. Proceso automatizado de preconcentración

2.3.2.5. Validación

La validación de la metodología se realizó de acuerdo a normativas internacionales mediante la evaluación de la exactitud, precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación y selectividad.

Para esto se prepararon soluciones estándar de BeP y análogos estructurales o sustancias interferentes tales como MP y PP, cada uno a una concentración de 1,00 mg mL⁻¹. En el caso del estudio de recuperación, los estándares se agregaron a seis alícuotas de 1,00 g de muestra de protector solar y a seis alícuotas de 10,00 mL de muestra de agua, en ambos casos sin ningún tratamiento. Los estándares se agregaron dentro del rango de concentración de 0,05-1,25 mg g⁻¹ y 1,11x10⁻⁵-0,025 mg mL⁻¹ para la muestra cosmética y la muestra de agua,

respectivamente. Posteriormente, se procesaron las muestras como se describió anteriormente y se analizaron por triplicado. Se calculó la recuperación de las muestras enriquecidas.

2.3.3. Síntesis de MIS sobre un electrodo de carbono vítreo modificado con nanopartículas de oro electrodepositadas para la determinación de butilparabeno.

2.3.3.1. Preparación del electrodo

2.3.3.1.1. Pretratamiento del electrodo de trabajo

Antes de la modificación, el GCE se pulió mecánicamente con una suspensión de alúmina de 1, 0,5 y 0,3 μm , luego se enjuagó y se sonicó en agua destilada y etanol durante 5 minutos. Posteriormente, el electrodo se trató con una solución de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (30%, 3:1, v/v) durante 5 minutos y se enjuagó con agua bidestilada durante 5 minutos. El electrodo se sumergió en una solución de H_2SO_4 1 mol L^{-1} y, posteriormente, el potencial fue escaneado de 0 a +1,4 V (velocidad de barrido 6 mV s^{-1}). Finalmente, el electrodo se enjuagó con etanol.

2.3.3.1.2. Electrodeposición de nanopartículas de oro

Para el procedimiento de electrodeposición de AuNPs, el GCE se sumergió en una solución de HAuCl_4 0,6 mmol L^{-1} que contenía 0,1 mol L^{-1} de KCl (preparado en agua doblemente destilada y burbujeada con nitrógeno) como electrolito de soporte. Después de eso, se aplicó un valor potencial constante de -200 V durante 60 segundos. Luego, el electrodo modificado GCE/AuNPs se enjuagó con agua doblemente destilada y se secó cuidadosamente con gas nitrógeno puro.

2.3.3.1.3. Preparación de la película de siloxano con impresión molecular (MIS).

La preparación de la película MIS se esquematiza en la Figura 2.2. En primer lugar, para promover la adhesión de la película MIS sobre la superficie del GCE/AuNPs, el electrodo se sumergió en una solución de 3-MPTS en etanol (40 mmol L^{-1}) durante 2 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente, la superficie del electrodo se lavó con etanol para eliminar las moléculas de silano adsorbidas físicamente y el electrodo se sumergió en una solución acuosa de HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) durante 1 hora para promover la hidrólisis de la capa de 3-MPTS y se secó a 50°C durante 30 minutos, dando como resultado la formación de una capa de MSL sobre la superficie del GCE/AuNPs (GCE/AuNPs-MSL). Posteriormente, se probaron diferentes proporciones de solventes de síntesis. Una de las proporciones que dio buenos resultados fue: $400 \mu\text{L}$ ($1,8 \text{ mmol}$) de TEOS, $65 \mu\text{L}$ ($0,27 \text{ mmol}$) de PTEOS, $65 \mu\text{L}$ ($0,37 \text{ mmol}$) de APTMS, $100 \mu\text{L}$ de solución de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, como catalizador, y $90 \mu\text{L}$ de H_2O en $3,00 \text{ mL}$ de 2-etoxietanol. La solución se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 1,5 horas, y se depositaron $5 \mu\text{L}$ sobre la superficie del electrodo previamente tratado. Posteriormente, se secó a 50°C durante 3 horas, dando lugar al GCE/AuNPs-NIS.

Para obtener el MIS, se agregaron $650 \mu\text{L}$ de una solución estándar de BuP $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ en 2-etoxietanol a $2,00 \text{ mL}$ del sol descrito anteriormente y la solución resultante se agitó durante 2 horas. Se preparó una capa de MIS en la superficie GCE/AuNPs-MSL en las mismas condiciones que pasa el NIS. Luego se retiró el electrodo y se secó a 50°C durante 3 horas. Para eliminar las moléculas de BuP y dejar libres las cavidades se sumergió el electrodo seco en una solución de metanol que contenía ácido acético al 10% durante 20 minutos a 150 rpm , y luego se secó a 50°C durante 5 minutos, el proceso se repitió 5 veces

y posteriormente se obtuvo el GCE/AuNPs-MIS. El grosor promedio de la película MIS fue de aproximadamente 3 μm .

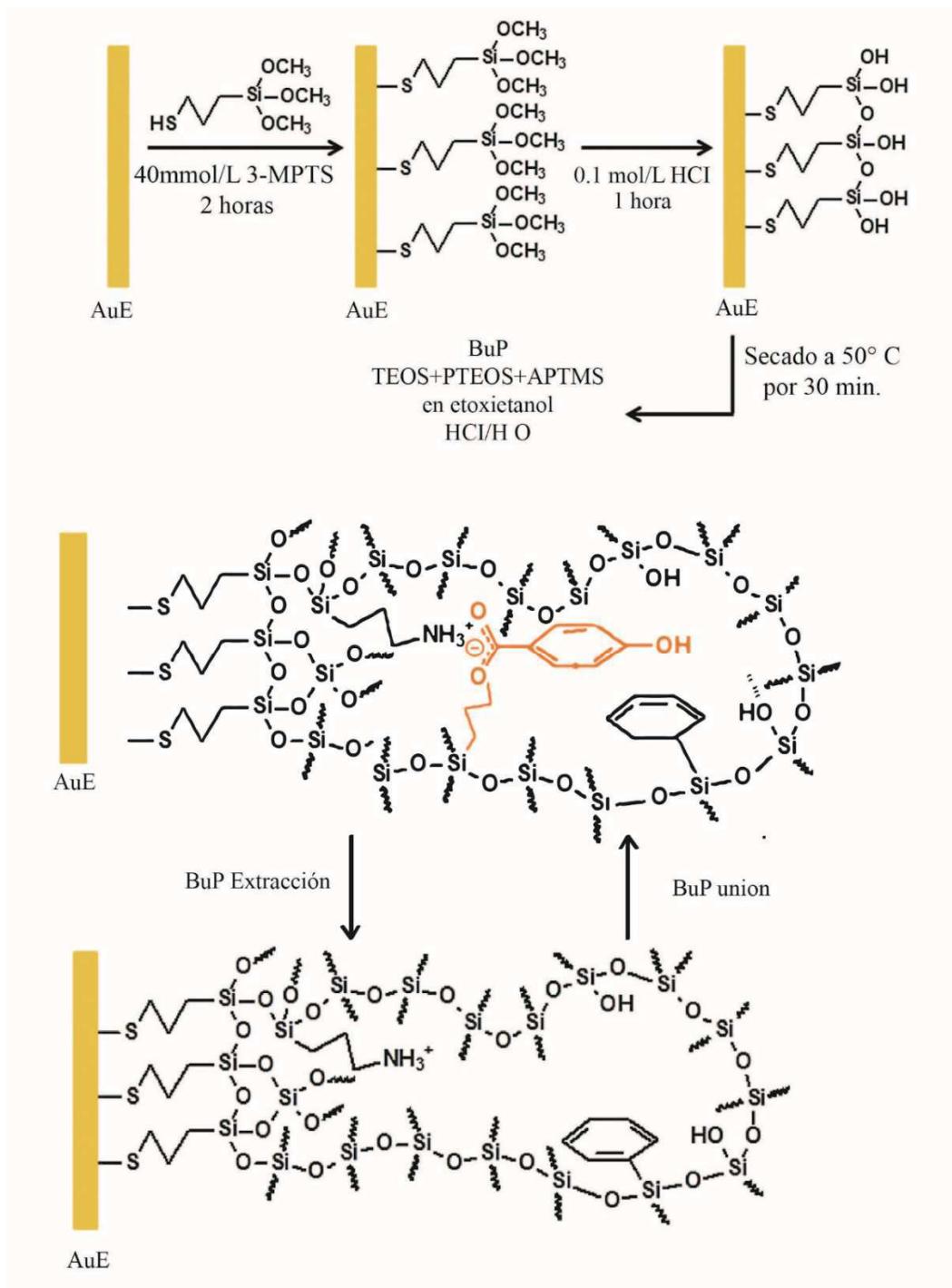


Figura 2.2. Representación esquemática de la síntesis de MIS.

2.3.3.1.4. Experimentos de unión

El GCE/AuNPs-MIS fue testeado sumergiéndolo durante 20 minutos en una solución patrón de BuP 0,01 mol L⁻¹ preparada en etanol/agua 2:8 (v/v), seguido de una caracterización electroquímica por voltametría de onda cuadrada (SWV) en una solución de H₂SO₄ 1,00 mol L⁻¹ pH 2,5. El tiempo de incubación para los experimentos de adsorción-desorción se seleccionó de tal manera que se obtuviera una alta sensibilidad y estabilidad de la respuesta actual.

2.3.3.2. Preparación de la Muestra

Como muestra analítica se utilizaron, toallitas de limpieza facial que declaraba en su composición MP, PP y BuP y por otra parte agua micelar que no declaraba contener conservantes en su composición.

Como muestra analítica se utilizaron 2 toallitas de limpieza facial, las cuales se colocaron en un vaso de precipitado con 100 mL de agua MilliQ y se llevó a ebullición durante 2 minutos. El líquido resultante se filtró y el procedimiento se repitió para asegurarnos de extraer de manera cuantitativa el BuP presente en la muestra. Las dos alícuotas se combinaron y se llevaron a 250 mL con agua MilliQ.

En el caso de la muestra de agua micelar se homogeneizó y se tomó una alícuota de 1,00 mL y se diluyó a un volumen final de 25,00 mL con agua MilliQ.

2.3.3.3. Medidas electroquímicas

Luego del acondicionamiento de las muestras, las mismas se utilizaron para la determinación de BuP usando el GCE/AuNPs-MIS. Se usaron los siguientes parámetros instrumentales para

registrar los voltamogramas de onda cuadrada: amplitud de potencial de pulso, 60 mV; salto de potencial 6 mV y frecuencia, 15 Hz.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA UTILIZANDO POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA LA MONITORIZACIÓN DE PROPILPARABENO EN PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL Y EFLUENTES

En la actualidad, existen varias técnicas que se utilizan a menudo para cuantificar ingredientes prohibidos o restringidos en PCPs. Sin embargo, teniendo en cuenta los requisitos de sensibilidad y selectividad, en la mayoría de los casos son necesarios pasos de pretratamiento de muestra [140]. Para este propósito, la SPE y la microextracción en fase sólida (SPME) [141, 142] son las alternativas más comunes debido a su simplicidad y eficacia. Sin embargo, la baja selectividad asociada con la SPE tradicional, a menudo conduce a la co-extracción de muchos componentes de la matriz. Por este motivo, se

desarrolló un MIP capaz de interaccionar selectivamente con el analito de interés. Además, el uso del MIP en combinación con técnicas separativas permitió obtener mejores resultados que con el uso de cartuchos SPE tradicionales en términos de enriquecimiento del analito y eficiencia de limpieza de la matriz.

Entre los parabenos existentes, se seleccionó el PP como molécula diana debido a su uso masivo como conservante en PCPs en combinación con el MP. Sin embargo, la concentración permitida para el PP es más estricta que para el MP debido a su mayor toxicidad, por lo que es necesaria contar con una metodología selectiva y sensible para monitorear el PP en las muestras bajo estudio.

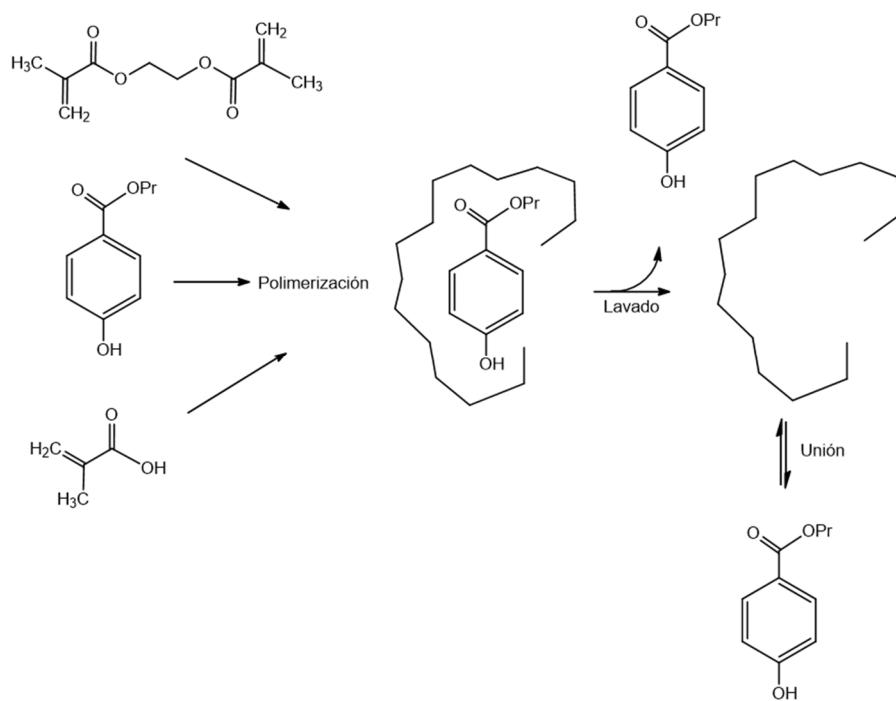


Figura 3.1. Representación esquemática del procedimiento propuesto para la obtención del MIP.

3.1.1. Síntesis del polímero

Los MIPs se sintetizaron por un procedimiento de polimerización en masa de acuerdo con un enfoque no covalente debido a la simplicidad del procedimiento. Este enfoque permitió, a través de una etapa de mezclado, la interacción entre el monómero funcional y la molécula elegida como plantilla, en este caso el PP.

Un aspecto fundamental a evaluar en la síntesis del polímero es la influencia del porógeno en el rendimiento y la capacidad de retención del polímero, para esto se evaluaron diferentes solventes tales como acetonitrilo y tolueno. El uso de tolueno mostró un mayor rendimiento y MIPs con mayor selectividad para el PP; por lo tanto, se seleccionó como porógeno para los próximos experimentos. La selección del monómero funcional y el agente de entrecruzamiento se basó en los resultados observados en trabajos previos [143].

Finalmente, el PP se seleccionó como molécula molde, el MAA como monómero funcional, el EGDMA fue elegido como reticulante y el BPO se utilizó como iniciador radicalario. Para la selección de BPO, se tuvo en cuenta la facilidad para producir radicales libres por termo-descomposición y su amplia disponibilidad. Otro aspecto importante a optimizar fueron las relaciones molares entre la plantilla y el monómero funcional, para esto, se sintetizaron diferentes polímeros utilizando diferentes relaciones molares (1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:16) y los resultados se expresaron en términos de capacidad de retención de PP. La retención de PP se mejoró levemente con el aumento de la concentración de monómero, llegando al nivel más alto cuando se utilizó una relación molar de 1:6 (plantilla:monómero). Al utilizar relaciones molares en el intervalo 1:6 a 1:16 no se observaron mejoras y, por lo tanto, se seleccionó una relación molar de 1:8. Finalmente, para la síntesis del polímero se empleó la mezcla de plantilla:monómero:reticulante con una

relación molar de 1:8:25, respectivamente. Teniendo en cuenta que las interacciones entre el monómero funcional y la plantilla se dan a través de enlaces puente hidrógeno, se concluyó que esta proporción condujo a un buen compromiso entre la capacidad de adsorción y la selectividad. El exceso de monómero funcional resultó en un mayor número de sitios de unión. Después de la optimización, se seleccionó una relación de 2:8 entre monómero más reticulante y porógeno. Este resultado estuvo en concordancia con los datos obtenidos en trabajos previos [144, 145]. Además, el BPO representó el 1% del peso total del monómero utilizado.

3.1.2. Caracterización morfológica del polímero

La morfología del polímero se investigó utilizando por un lado, el método BET a partir de isotermas de adsorción-desorción de N₂ y por otro lado, se analizó a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). La isoterma de adsorción-desorción de N₂ a 77 K para el NIP y MIP, se muestra en la figura 3.2. (a). Estos materiales presentan una isoterma reversible tipo II (sin ciclo de histéresis), típica para adsorbentes no porosos o macroporosos [146]. Las isotermas de adsorción de ambos polímeros aumentan rápidamente en función del volumen de N₂ adsorbido a presiones relativas superiores a 0,9 Pa, debido a la adsorción de N₂ en mesoporos o macroporos más grandes, como puede verse en la figura 3.2 (b), concluyendo que estos polímeros presentan poros con tamaños superiores a los 40 nm. El V_{TP} (volumen total de poro) de los polímeros MIP y NIP fue de 0,03 y 0,02 cm³ g⁻¹, respectivamente. El S_{BET} (área de superficie específica) del MIP y NIP fue de 10,0 y 6,5 m² g⁻¹, respectivamente. El aumento del área de superficie específica puede estar relacionado con la formación de una cavidad selectiva a la plantilla y está ausente en el polímero no

impreso. De acuerdo con el estudio BET, en el análisis SEM se observó que las partículas del MIP mostraron un tamaño más pequeño con un diámetro medio de aproximadamente 2,15 μm , mientras que en el caso del NIP el diámetro medio fue de 5,77 μm (Fig 3.3).

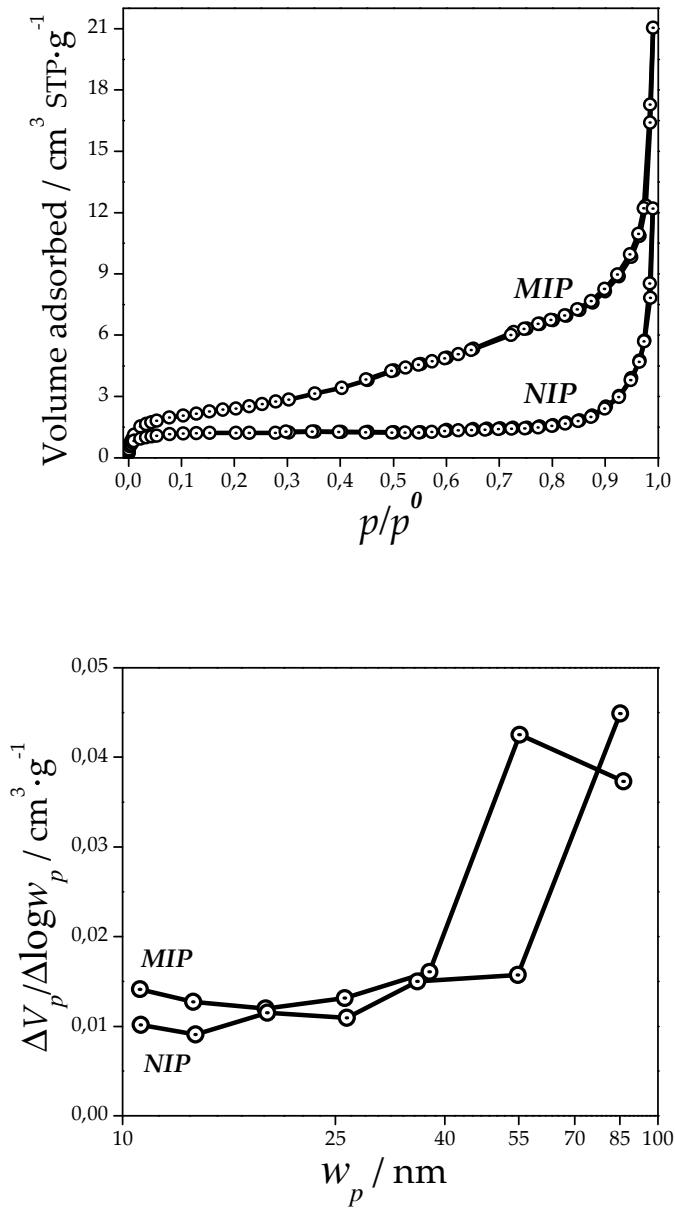


Figura 3.2. a) Isotermas de adsorción-desorción de N_2 a 77 K para el NIP y MIP. b)

Distribuciones de tamaño de poro para el NIP y MIP.

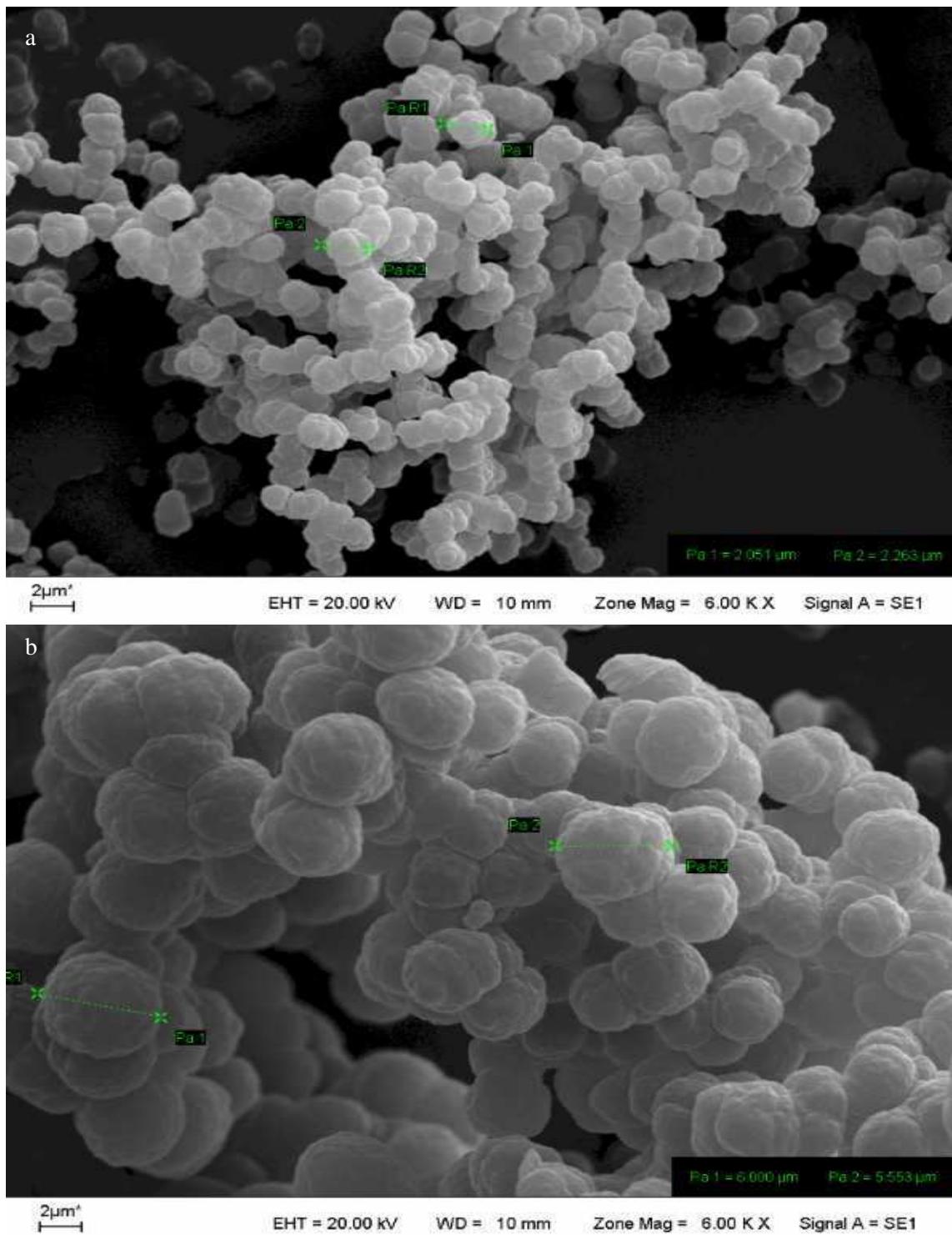


Figura 3.3. Imágenes de SEM de (a) polímero MIP y (b) polímero NIP.

3.1.3. Estudio de optimización en *batch*

En primer lugar, se evaluó mediante un estudio en *batch*, la influencia de los siguientes parámetros: cantidad de polímero, naturaleza del solvente de interacción, tiempo de interacción, pH de la muestra, naturaleza y volumen del solvente de elución.

Se evaluaron diferentes solventes de interacción y mezclas de estos en proporciones variables. Se seleccionó el más adecuado en relación a la capacidad de retener la molécula de analito y considerando además que fuera un solvente no contaminante. Respecto de la cantidad de polímero se investigó cuál es la menor cantidad de polímero que podía lograr la mayor retención de PP en el menor tiempo de interacción. Si bien al aumentar la cantidad de polímero y el tiempo de contacto aumentaba la cantidad de analito adsorbida se estudió a partir de qué valor ese aumento no era significativo. Se pudo concluir que los mejores resultados para la adsorción del analito se lograron utilizando 20,00 mg del polímero, una solución etanol:agua 2/8 (v/v) como solvente de interacción y un tiempo de contacto de 20 minutos.

Otro punto importante a evaluar a la hora de aplicar el procedimiento MISPE a una muestra real fueron las propiedades electrolíticas tales como el pH y la fuerza iónica. Para esto se estableció un intervalo de pH dependiendo de las características de la muestra, en nuestro caso de 5,0 a 9,0. En el intervalo analizado no se vio afectada la capacidad de retención del MIP, esto responde al hecho, de que los parabenos son compuestos no iónicos para el intervalo de pH estudiado.

Asimismo, se realizaron experiencias para conocer el volumen necesario para eluir la máxima concentración de PP. Se estableció que al aumentar el volumen de eluyente,

también aumentaba la elución del analito. Sin embargo, se buscó que ese volumen fuera el mínimo posible para no diluir el analito y así disminuir la sensibilidad de la metodología. Respecto a la naturaleza de la solución de elución se evaluaron diferentes soluciones y mezclas de solventes en proporciones variadas. Al igual que en el estudio para seleccionar el solvente de interacción más adecuado, se optó por la solución capaz de desorber eficientemente la mayor cantidad de PP y potencialmente menos contaminante. Por lo tanto al finalizar las experiencias para obtener una elución efectiva del analito en estudio, se utilizó un volumen de 200 μL de una mezcla etanol:agua 8/2 (v/v) como solvente de elución. Una vez optimizadas estas condiciones fueron utilizadas como base para definir los valores más adecuados para su utilización en un sistema en flujo.

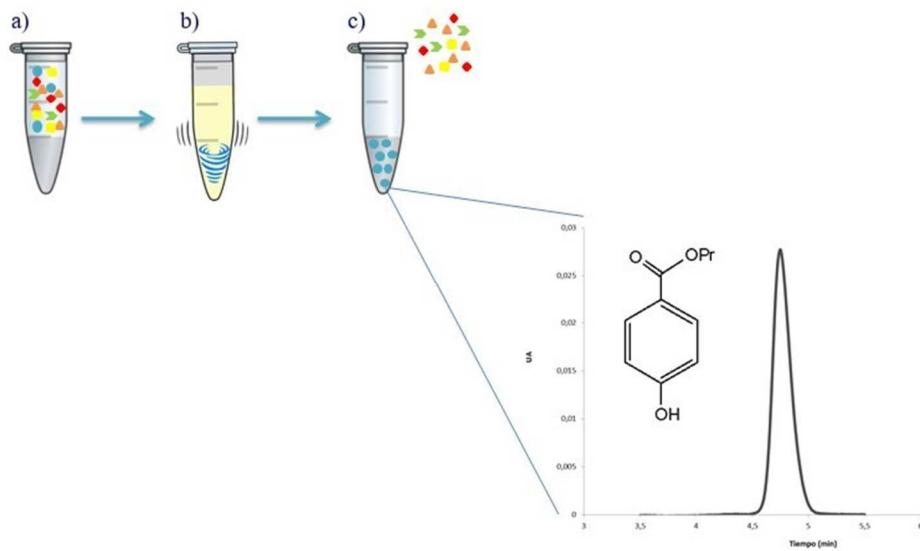


Figura 3.4. Representación esquemática del estudio de optimización en batch. a) Adición de la muestra al MIP. b) Interacción de los diferentes analitos con el polímero. c) Adsorción selectiva de PP.

3.1.4. Selección del Solvente de Interacción

La alta selectividad del polímero MIP se debe principalmente a la formación de una cavidad específica para un analito particular. Existen diferentes variables que afectan la unión del analito a esta cavidad entre las que se pueden nombrar, naturaleza del solvente utilizado para establecer la interacción, cantidad de MIP utilizado en los ensayos, tiempo y modo de agitación, entre otros. La capacidad de unión de MIPs se evaluó poniendo en contacto el polímero con estándares de PP preparados en varios medios de disolución: agua, acetonitrilo, metanol, etanol, propanol, n-hexano, tolueno y sus mezclas en diferentes proporciones (Fig 3.5). Aunque el disolvente utilizado como porógeno para la síntesis de MIP, como se describió en varios informes, es el medio más adecuado para la interacción MIP-PP, no fue aplicable para la presente metodología [144]. Teniendo en cuenta que la molécula plantilla se retenía escasamente cuando se utilizó tolueno como medio de disolución de PP, se probaron otros solventes para preparar los estándares. Después de las evaluaciones experimentales, las mezclas etanol/agua en relación 2:8 y 1:9 mostraron una retención casi cuantitativa (91% y 97%, respectivamente) (Fig. 3.6). Sin embargo, la relación etanol/agua 2:8 (v/v) se consideró el disolvente más apropiado porque no solo es adecuada para la interacción MIP-PP sino que también mejoró la selectividad del polímero. Esta última afirmación se basa en los resultados del análisis de los sobrenadantes para MIP y NIP en un sistema HPLC-DAD. En el caso de la relación 1:9, la retención de analitos en los MIPs fue alta; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con el NIP. Por el contrario, cuando se usa una relación molar de 2:8, se mejoró la retención selectiva de MIP. Esto también se observó en la síntesis de un MIP utilizado para el reconocimiento de PAs en condiciones experimentales similares a las nuestras.

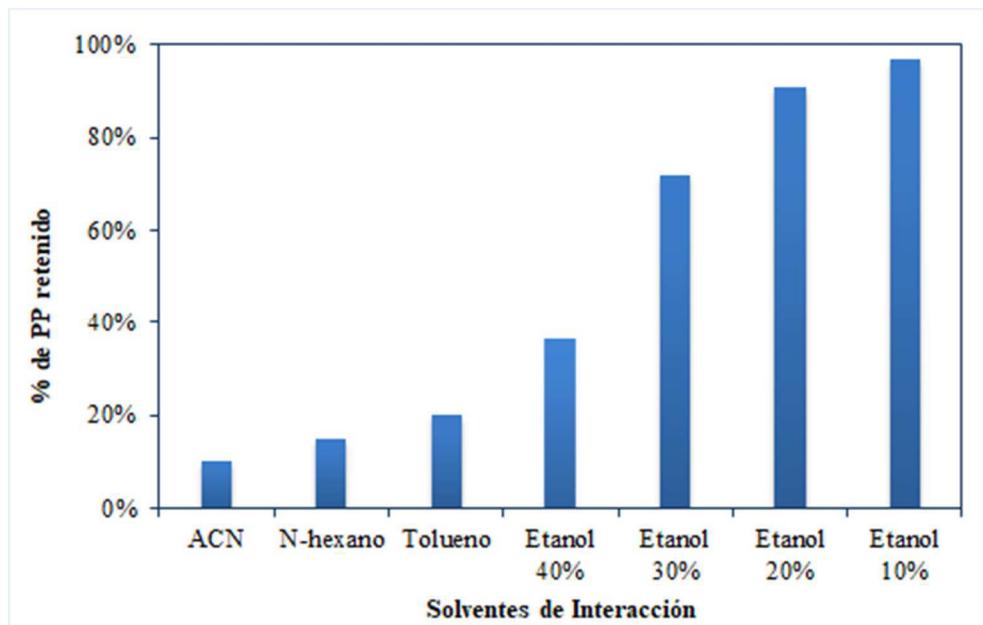


Figura 3.5. Optimización del solvente de interacción. PP retenido en función del solvente de interacción.

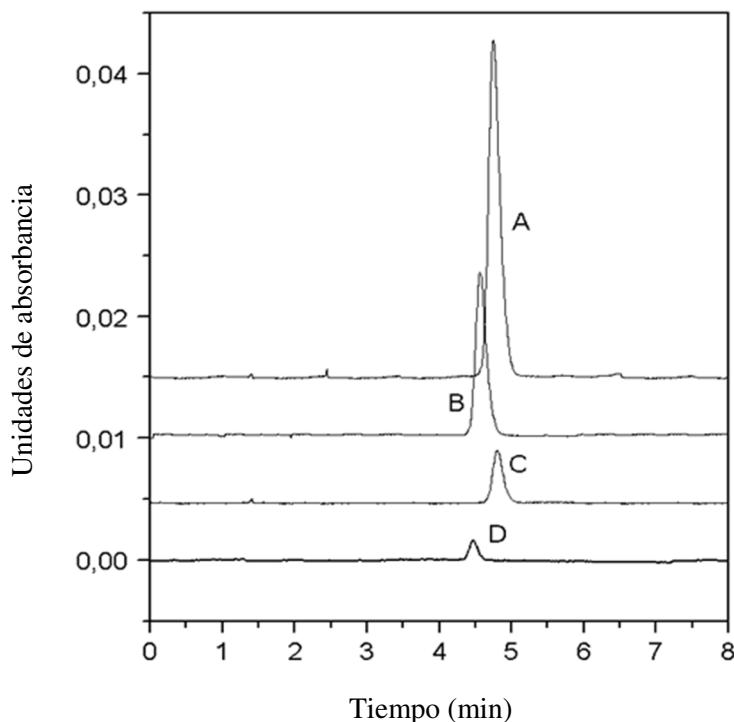


Figura 3.6. Cromatogramas del sobrenadante obtenido después de la interacción MIP-PP.

Medio de disolución de patrones de PP compuesto por etanol/agua: a) relación 4: 6; b) relación 3: 7; c) relación 2: 8; d) relación 1: 9.

3.1.5. Evaluación de la especificidad de las cavidades del polímero

La eficacia del efecto de impresión puede estudiarse correctamente mediante el análisis del factor IPB (*Imprinting-induced promotion of binding*) que describe la calidad de la interacción Analito-MIP (AMIP). El IPB se define como:

$$\text{IPB} = (A_{\text{MIP}} - A_{\text{NIP}})/A_{\text{NIP}}, \text{ donde } A_{\text{NIP}} \text{ es la cantidad de analito retenido por el NIP}$$

La retención selectiva de los complejos MIP-PP y NIP-PP se evaluó mediante el cálculo de los factores IPB en sistemas con diferentes disolventes de interacción. Los factores IPB de

las mezclas que mostraron los mayores porcentajes de retención fueron 0,176 y 0,005 para las relaciones etanol/agua de 2:8 y 1:9, respectivamente. Por esta razón, se seleccionó la mezcla de relación 2:8 como el solvente de interacción. La existencia de una cavidad complementaria específica para PP, se evaluó a través de un ensayo de unión, en el cual el estándar empleado contenía una mezcla de PP y compuestos con propiedades fisicoquímicas similares y comúnmente combinados en formulaciones cosméticas tales como BA y MP. Usando esta ecuación, el IPB obtenido para PP fue 0.176, mientras que para BA y MP fueron 0,031 y 0,039, respectivamente (Tabla 3.1). Estos resultados demostraron una unión selectiva entre el MIP y PP cuando este último se encuentra en solución con moléculas análogas.

	Ac. Benzoico	MP	PP
IPB	0,031	0,039	0,176

Tabla 3.1. IPB de Ac. Benzoico, MP y PP

3.1.6. Optimización de la cantidad de polímero y tiempo de interacción

Después de la selección del solvente de interacción, se investigó la cantidad de polímero necesaria para obtener la máxima adsorción de PP. El estudio se llevó a cabo dentro de un rango de 5,00-30,00 mg de MIP y el porcentaje máximo de adsorción se alcanzó cuando se utilizaron 20,00 mg del polímero. Cuando la cantidad de polímero fue mayor a 20,00 mg, no se observó ninguna mejora en la cantidad de PP retenido (Fig 3.7). Además, se evaluó el

efecto del tiempo de interacción dentro de un intervalo de 1-45 minutos. No se observaron diferencias apreciables en el porcentaje de retención de PP al aumentar el tiempo de interacción por encima de 20 minutos; por lo tanto, se seleccionaron 20 minutos para asegurar la adsorción de la máxima cantidad de analito en el menor tiempo de análisis (Fig 3.8).

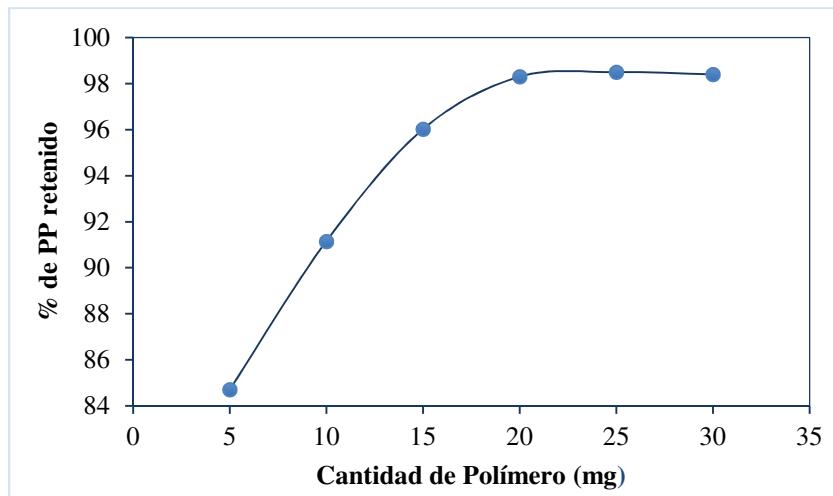


Figura 3.7. Optimización de la cantidad de polímero. PP retenido en función de la cantidad de polímero utilizado.

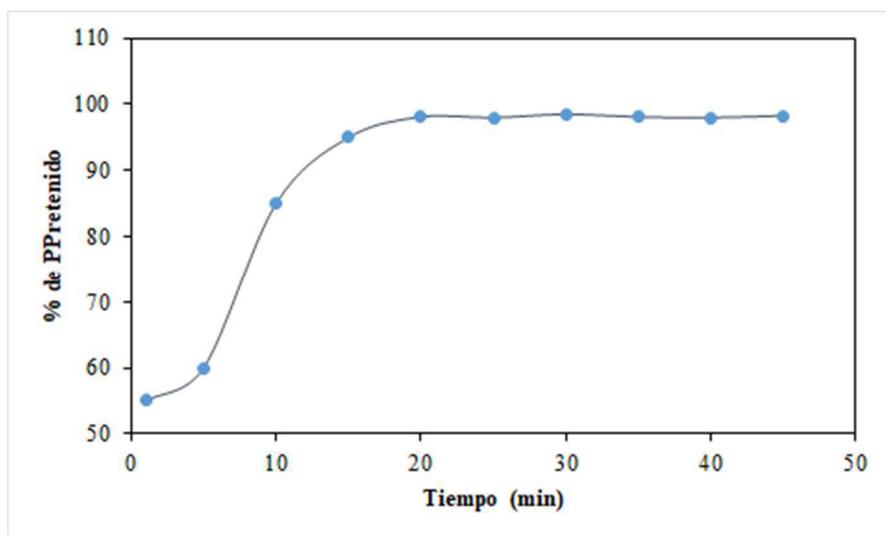


Figura 3.8. Optimización del tiempo de interacción.

3.1.7. Influencia del pH de la muestra en la interacción MIP-PP

El pH de los paños y toallitas húmedas utilizados para la higiene de lactantes y bebés empleados como muestras analíticas, generalmente se encuentra dentro del intervalo 5,5-6,5 y el pH de las muestras ambientales analizadas varía entre $6,0-7,0 \pm 0,5$. Considerando que el pH de las muestras puede influir en la interacción entre el analito y el polímero, el efecto de este parámetro se estudió dentro del intervalo 5,0-9,0 (Fig 3.9). El procedimiento se aplicó como se describe en la sección procedimientos y se evaluó la capacidad de retención de PP al poner en contacto soluciones estándares de diferentes pH con el MIP. El porcentaje de retención en todos los casos fue superior al 93%, por lo que se puede concluir que la retención no se vio afectada por el pH de la muestra.

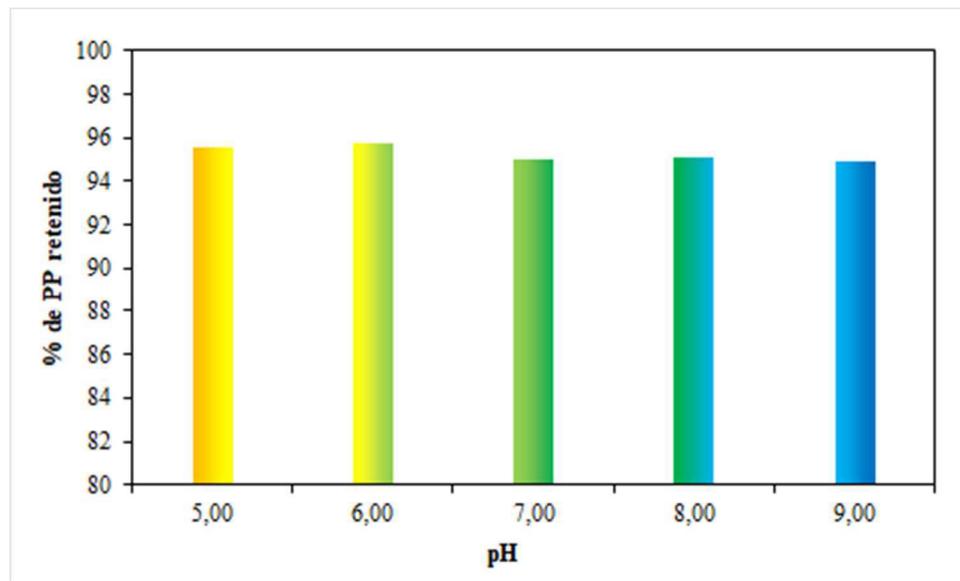


Fig 3.9. Estudio de la influencia del pH de la muestra sobre el porcentaje de BeP retenido por el polímero.

3.1.8. Evaluación de los parámetros de preconcentración

Varios factores pueden afectar la eficacia de preconcentración de los MIPs al aplicar la metodología en un sistema en flujo, extrínsecamente a su capacidad de unión. Para este propósito, se evaluaron algunos parámetros puestos en juego cuando se realiza preconcentración en flujo, tales como cantidad de polímero, tamaño de la columna utilizada para empaquetar el polímero y velocidad de flujo. Se estudió la velocidad de flujo del disolvente de elución en un intervalo de 0,50 a 3,00 mL min⁻¹, observando que a partir de 1,00 mL min⁻¹ no se observaron mejoras significativas en la eficacia de extracción (Fig 3.10). Por lo tanto, se seleccionó para el procedimiento de preconcentración, un flujo de 1,00 mL min⁻¹ a muestra y estándar. De acuerdo con los resultados obtenidos del sistema en batch, se evaluó la cantidad de MIP a utilizar en un rango de 10,00 a 30,00 mg (Fig 3.11). Se observó una capacidad de retención máxima cuando se utilizaron 20,00 mg de MIP, mientras que un exceso de adsorbente no produjo mejoras en el proceso de extracción. Por lo tanto, se usaron 20,00 mg del polímero como relleno para el armado de la columna de preconcentración, además una jeringa de 3,00 mL (diámetro interno de 0,5 cm) demostró ser el receptor más adecuado.

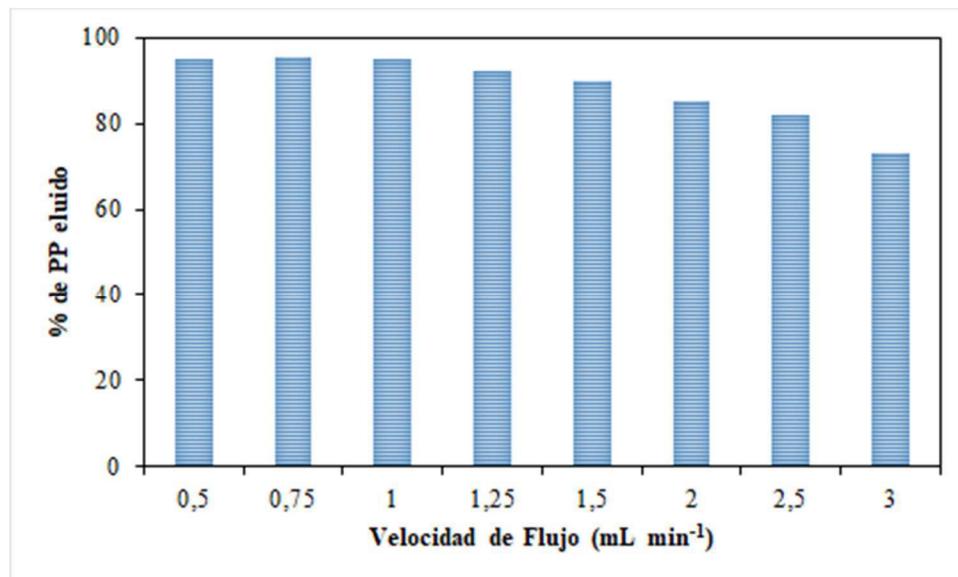


Figura 3.10. Optimización de la velocidad de Flujo.

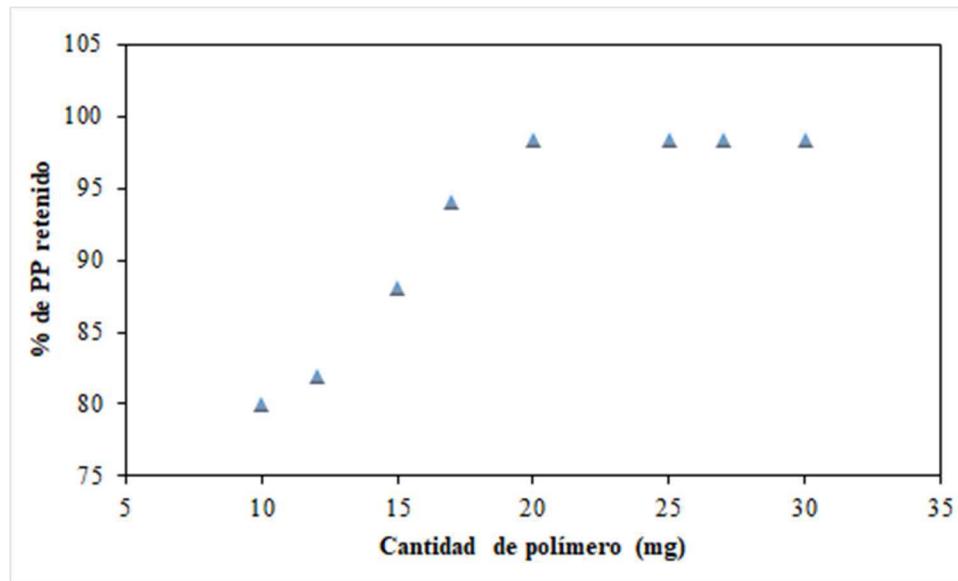


Figura 3.11. Optimización de la cantidad de polímero para un sistema en flujo.

3.1.9. Selección de solvente y volumen de elución

Después de la interacción de los diferentes solventes de elución con el complejo MIP-PP, el sobrenadante se inyectó en un sistema HPLC-DAD. Se observó una elución casi cuantitativa de PP cuando se utilizó como solvente de elución una solución de etanol/agua en una relación molar de 8:2 (v/v) (Fig 3.12). El procedimiento de elución se repitió con 200 µL adicionales y posteriormente se analizó el eluato mediante HPLC-DAD. Se observó que el 98% de PP retenido se desorbió con la primera alícuota, mientras que en la segunda alícuota de 200 µL, el PP restante se eluyó completamente. Para estudiar la posibilidad de efecto de arrastre, después de un procedimiento de extracción y elución, se realizó otra prueba sin cargar la muestra. Esto se investigó al nivel máximo de concentración de PP estudiada (500 ng mL^{-1}). Los cromatogramas obtenidos mostraron que no hubo efecto de arrastre entre los ensayos. Además, no se observaron mejoras apreciables aumentando el volumen de elución por encima de 200 µL. Como resultado, el volumen más bajo que permitió la elución del 98% de PP fue 200 µL; por lo que fue seleccionado para los siguientes estudios (Fig 3.13).

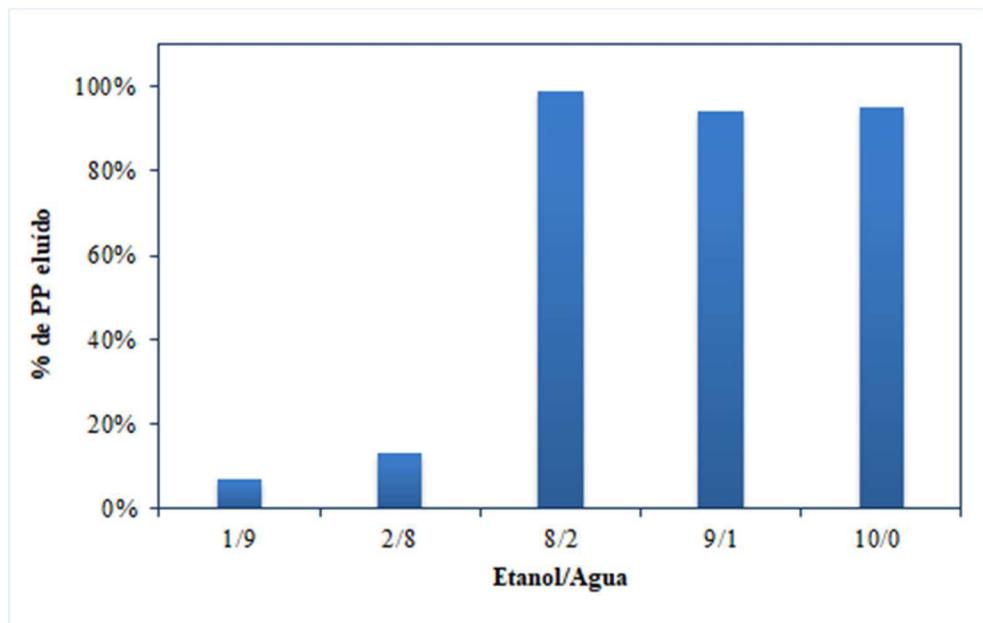


Figura 3.12. Porcentaje de elución de PP para las diferentes relaciones Etanol/Agua.

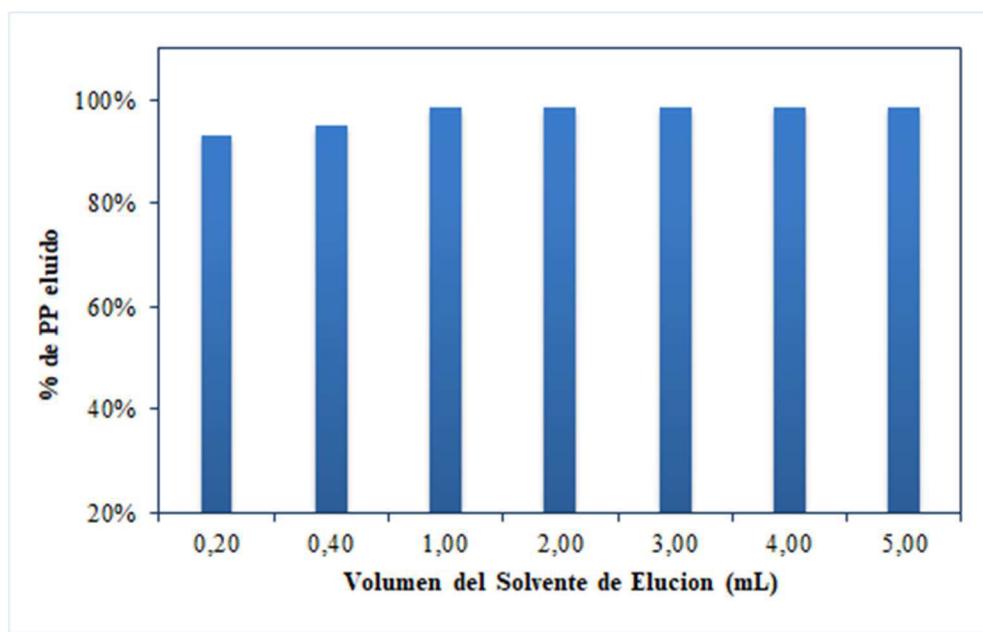


Figura 3.13. Porcentaje de elución de PP en función de la cantidad de solvente de elución utilizado.

3.1.10. Validación

La validación analítica de esta metodología se realizó de acuerdo con las directrices internacionales de la ICH (Conferencia Internacional sobre Armonización) [147]. Las muestras de toallitas comerciales utilizadas para la higiene de bebés, libres de PAs, sirvieron como referencia durante la validación del método analítico propuesto. La evaluación de la linealidad de la metodología MISPE-HPLC-DAD se llevó a cabo con muestras PCP “libres de PAs” enriquecidas con soluciones estándar de PP con concentraciones que variaron de 24,00 a 500 ng mL⁻¹. El procedimiento fue desarrollado utilizando muestras enriquecidas por triplicado a seis niveles de concentración y las áreas de los picos obtenidos se usaron para realizar las curvas de calibración. Las ecuaciones de calibración se obtuvieron mediante el método de regresión lineal de mínimos cuadrados y se usaron para el cálculo de concentraciones desconocidas. Los valores analíticos obtenidos se muestran en la Tabla 3.2. El valor de la prueba F obtenido (13036.81 a un nivel de confianza de 95) fue menor que el tabulado, lo que muestra que el método tiene un comportamiento lineal. El análisis de varianza (ANOVA) se calculó utilizando MINITAB15. Un valor de probabilidad (p) menor que 0.001 en el ANOVA indicó un nivel de confianza del 95%.

La cantidad de analito, que produjo una relación señal/ ruido ≥ 3 se consideró el límite de detección (LOD, *limit of detection*). El límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*) se calculó como la concentración de analito que pudo determinarse con precisión y exactitud con una relación señal/ruido ≥ 10 . Tanto el LOD como el LOQ se evaluaron basándose en la señal del ruido obtenida con el análisis de una solución estándar diluida ($n = 6$) (Tabla 3.2). Para garantizar que el LOQ se cuantificó con una exactitud y

precisión aceptable, se evaluó la desviación estándar y el coeficiente de variación. La exactitud inter ensayo para el LOQ ($8,00 \text{ ng mL}^{-1}$), fue de 2,12 (expresada como SD, n=6) y la precisión inter ensayo, fue de 13,34 (expresada como CV%, n=6).

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se refiere a la variabilidad cuando el método es realizado por el mismo analista en un período de tiempo corto, mientras que la precisión intermedia se refiere a la precisión cuando uno o varios factores cambian en el método. En ambos casos, la precisión se expresó mediante desviaciones estándar relativas (RSD) de los tiempos de retención y las áreas de los picos corregidos. La repetibilidad de todo el procedimiento analítico se evaluó aplicando la metodología a 2 alícuotas de PCP "libres de PAs" enriquecidas con PP y analizadas por HPLC-DAD por triplicado en el mismo día. Los valores de RSD obtenidos en la determinación de PP fueron en todos los casos inferiores al 1,75 % para el tiempo de retención y al 2,11 % para el área del pico corregido (Tabla 3.3). Para la evaluación de la precisión intermedia, se varió, el día de operación, el operador y los reactivos o electrolitos. Por lo tanto, todo el procedimiento analítico se realizó durante tres días consecutivos utilizando una muestra "libre de PA" con el agregado de PP estándar y los valores de RSD obtenidos fueron de 1,59 % para el tiempo de retención y 1,86 % para el área de pico corregida (Tabla 3.3). Para investigar la capacidad de reutilización de los polímeros sintetizados, se realizaron 5 ciclos de adsorción-desorción por día. El procedimiento se llevó a cabo en las mismas condiciones que las descritas previamente y se repitió durante 5 días consecutivos, no se observaron diferencias significativas en los resultados.

La exactitud se evaluó en términos de porcentaje de recuperación, mediante la aplicación del método propuesto a una muestra de PCP "libre de PAs" enriquecida con cantidades

conocidas de soluciones de PP a seis niveles de concentración (n=6). El estudio se realizó como se describió previamente y los líquidos de elución se analizaron por HPLC-DAD por triplicado. La concentración de la primera alícuota fue utilizada en el resto del estudio como valor base para el cálculo de los porcentajes de recuperación de las alícuotas siguientes. Cada determinación se realizó por triplicado y las concentraciones promedio determinadas para PP se utilizaron para calcular los porcentajes de recuperación. En la Tabla 3.4 se puede observar que los porcentajes de recuperación obtenidos variaron desde 86,15% hasta 110,50%, valores que pueden ser considerados adecuados. Estos resultados además demostraron que las matrices de PCP analizadas en este experimento tenían poco efecto sobre la eficacia de la extracción y, por lo tanto, la ausencia de efecto de matriz.

La especificidad del método se investigó tanto mediante la pureza de pico como mediante experimentos de adición con compuestos estándar puros y la posterior obtención de los porcentajes de recuperación. La pureza de pico se evaluó a través del software del sistema UniPointTM, utilizando un detector de arreglo de diodos. La comparación de los cromatogramas de la muestra de PCP enriquecida con el analito y compuestos relacionados a nivel de LOQ con los cromatogramas de la muestra de PCP sin adición del analito contribuyó a la evaluación de la selectividad del método desarrollado. No pareció haber interferencia por parte de los constituyentes de la muestra, lo que estuvo en concordancia con los resultados de la prueba de recuperación.

Parámetros Analíticos		
Rango lineal (ng mL ⁻¹)		8-500
Pendiente		1,28×10 ⁹
Ecuación de Regresión	Ordenada al Origen (O.O)	44593,81
r ²		0,9998
LOD (ng mL ⁻¹)	HPLC	17,20
	HPLC-MISPE	2,40
LOQ (ng mL ⁻¹)	HPLC	57,30
	HPLC-MISPE	8,00

Tabla 3.2. Validación del método con respecto a la linealidad, LOD, LOQ.

	RSD para el Tiempo de Retención (%)	RSD para el Área de Pico Corregida (%)
Repetibilidad (día 1)	1,75	2,11
Repetibilidad (día 2)	0,05	2,07
Repetibilidad (día 3)	1,02	1,70
Precisión intermedia (entre días)	1,59	1,86

Tabla 3.3. Repetibilidad y Precisión intermedia obtenidas luego de modificar el día de operación, valores de RSD (%) correspondientes al Tiempo de Retención y Área de pico corregida de PP.

Alícuotas ^a	Valor base (ng mL ⁻¹)	PP adicionado (ng mL ⁻¹)	PP encontrado ^b (ng mL ⁻¹)	Recuperación ±SD (%) ^c
I	---	24,80	27,00	109,0±2,2
II	24,80	120,0	157,4	110,5±2,2
III	24,80	180,0	180,5	86,5±1,6
IV	24,80	240,0	231,4	86,1±1,7
V	24,80	320,0	329,7	95,3±1,5
VI	24,80	500,0	470,3	89,1±1,8

Tabla 3.4. Validación del método con respecto a la exactitud. Estudio de recuperación.^a1 mL de muestra de PCP libre de PAs adicionada con PP^bAnalito encontrado luego de aplicar el procedimiento desarrollado.^cPorcentaje de recuperación: [(Valor encontrado - valor base) / adiconado] x 100.

3.1.11. Utilización del polímero en extracción en fase sólida (MISPE): aplicación a una muestra real

Se evaluó la eficacia de este polímero para la extracción de PP de líquidos de toallitas para niños que contienen fragancias, humectantes, conservantes y otros ingredientes cosméticos.

Además, con el objetivo de determinar la utilidad para el análisis ambiental, se aplicó la metodología a muestras de efluentes. El estudio se realizó en muestras enriquecidas en el intervalo de concentración estudiado en 3 marcas diferentes de toallitas húmedas para

bebés. Se analizaron por HPLC-DAD muestras a las que se les aplicó la metodología MISPE según como se describió en la sección experimental. Paralelamente se analizaron también muestras que no fueron tratadas con esta metodología. Con el objetivo de comparar los resultados de eficiencia de extracción, el estudio también se realizó reemplazando el polímero con una cantidad adecuada de sorbente C18 disponible comercialmente (Enviro Clean®, tamaño de partícula de 40-63 µm) y silice gel. Estos sorbentes se colocaron en un tubo de polipropileno de 2,00 mL de capacidad y se aplicó el mismo procedimiento que se llevó a cabo con los MIP. Los resultados obtenidos mostraron valores dentro del intervalo 0,021-1,48 mg mL⁻¹ y se ilustran en la figura 3.14 El factor de recuperación (R%) obtenido después de usar cartuchos MISPE, C18-SPE y sílica-SPE se calculó de la siguiente manera:

$$R\% = (P_{Fr} / P_{Ft}) \cdot 100$$

Donde P_{Fr} es el factor de preconcentración real y P_{Ft} es el factor de preconcentración teórico, y se calculan mediante:

$$P_{Fr} = C_f / C_i$$

Siendo C_f y C_i la concentración final y la concentración inicial respectivamente.

$$P_{Ft} = V_i / V_f$$

Siendo V_i y V_f el volumen inicial y el volumen final, respectivamente.

El R% obtenido después de aplicar los métodos de extracción fue de 96,60; 64,80 y 0,79 para los procedimientos MISPE, C18-SPE y sílica-SPE, respectivamente. Se puede ver que el factor de recuperación para MISPE es significativamente mayor que el obtenido con los métodos SPE tradicionales. La selectividad de la metodología se evaluó en muestras reales

que contienen MP en su composición. Se observó que la capacidad de retención fue un 25% mayor para PP en comparación con MP.

En el caso de las toallitas “libres de PA”, el analito pudo detectarse en una muestra después de aplicar el proceso MISPE. También se investigaron muestras ambientales, en las cuales no se detectó PP.

Del análisis de las recuperaciones obtenidas luego de aplicar el procedimiento a las muestras enriquecidas con PP y realizar la cuantificación pudo concluirse que no se observaron efectos de matriz. El LOD y el LOQ logrados con esta metodología fueron adecuados para determinar PAs a niveles traza, requeridos para estudios ambientales.

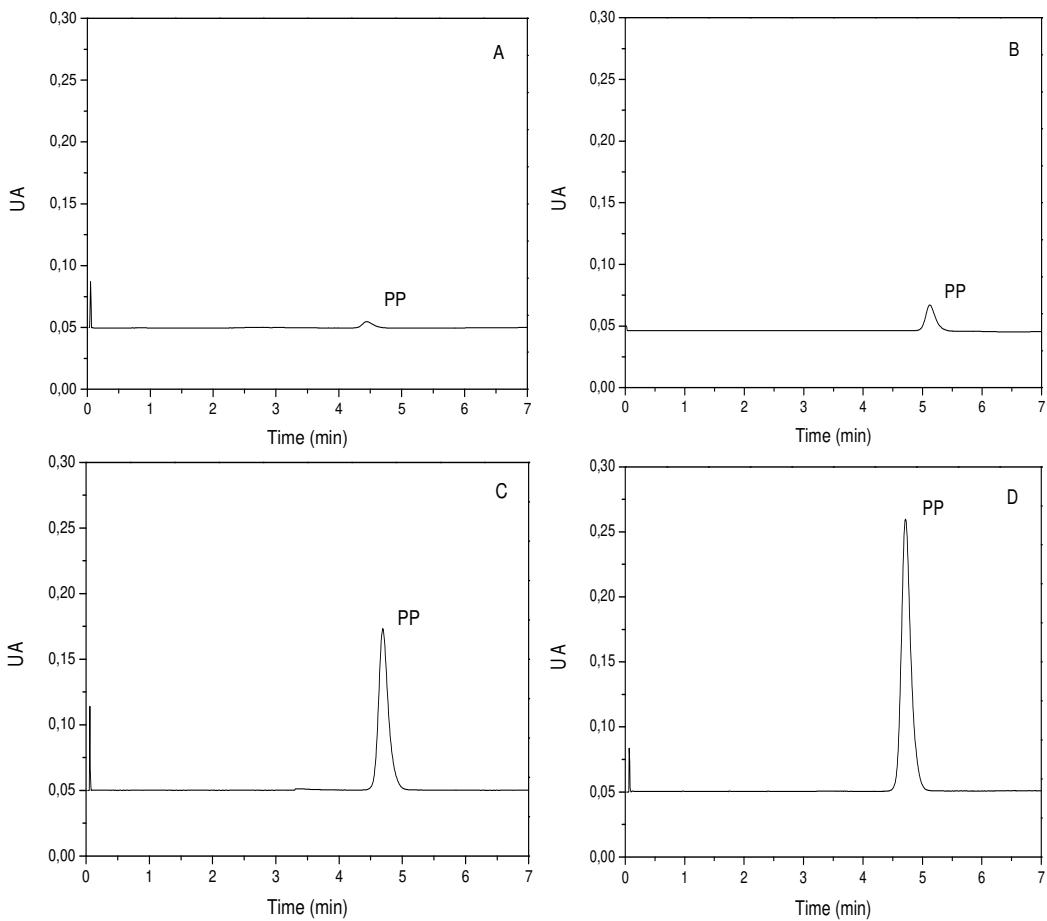


Fig 3.14. Cromatogramas de los líquidos de elución obtenidos antes y después del pretratamiento de la muestra. Muestra antes del pretratamiento (A), muestra después del pretratamiento con sílica gel, sorbente C18 y sorbente MISPE (B, C y D, respectivamente).

3.1.12. Conclusión

En este trabajo, se desarrolló la síntesis de MIP para la extracción en fase sólida de PP en PCPs y muestras ambientales. El procedimiento se optimizó para obtener un adsorbente selectivo. Se evaluaron la efectividad, la selectividad, la robustez y la capacidad de reutilización de los MIP sintetizados.

El factor principal que afectó el rendimiento de los MIP fue la composición del disolvente, tanto para la interacción como para los pasos de elución. Entre los solventes estudiados, las mezclas etanol/agua a 2:8 (v/v) permitieron una interacción específica MIP-PP mientras que en proporción inversa (8:2 v/v) dió como resultado un eluyente efectivo (más del 99% de PP fue eluido). La retención específica de PP-MIP se evaluó mediante factores IPB, que se compararon con moléculas análogas frecuentemente asociadas, tales como BA y MP, siendo más alto para PP. Además, se realizaron análisis de SEM y BET, que muestran un área de superficie mayor para MIP cuando se compara con NIP en las mismas condiciones de síntesis.

La metodología fue validada y aplicada a muestras reales que consisten en productos de cuidado personal y efluentes. Se alcanzaron bajos límites de detección y cuantificación ($2,40 \text{ ng mL}^{-1}$ y $8,00 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente). Se demostró que el MIP sintetizado podía preconcentrar PP incluso a concentraciones de nivel traza, mostrando su potencial para muestras de interés ambiental. Como material adsorbente, la capacidad de preconcentración de los MIP sintetizados era comparativamente más alta que los cartuchos de SPE tradicionales. Sin embargo, la principal ventaja de la aplicación de MIP, en lugar de aumentar la sensibilidad, es el potencial de analizar analitos específicos.

Del análisis de los resultados obtenidos al aplicar la metodología desarrollada a las muestras seleccionadas podemos afirmar que es conveniente en términos de simplicidad, considerando que los métodos informados previamente requieren pasos adicionales de preparación de la muestra, como agitación, centrifugación [148], calentamiento-agitación y control de la temperatura del solvente para evitar efectos de memoria [149]. Más aún, en el caso de todos los métodos informados de microextracción en fase líquida para separar PAs,

requieren un pH inferior a 6 ya que en estas condiciones su forma no disociada se puede extraer de manera eficiente [150]. Además, se necesita un largo tiempo de tratamiento de muestra [151] y, por lo tanto, el tiempo total requerido para el análisis es mayor. En nuestro caso, la simplicidad de la metodología radica en que se sintetiza el polímero una única vez pudiendo luego almacenarse para ser utilizado en cualquier momento y al disminuir el número de pasos de preparación de muestra se logra disminuir también potenciales fuentes de error.

Respecto de los métodos de SPE informados en la literatura, estos implican pasos adicionales para la evaporación de la muestra y la posterior reconstitución con altos volúmenes de disolventes orgánicos [152], también una etapa de agitación para los procesos de retención y elución [153]. Específicamente, las metodologías que implican el uso de MISPE para la extracción de PAs utilizan una mayor cantidad de polímero para el armado de la columna, lo que significa un mayor costo con la misma eficiencia de extracción. En el presente trabajo la cantidad necesaria de polímero es de 20,00 mg, muy inferior a otros trabajos publicados. También cabe destacar que el paso de reacondicionamiento de la columna que informamos aquí es más simple que métodos similares informados, lo que además de simplificar el procedimiento permite realizarlo con más rapidez, en un tiempo no superior a 15 minutos [143].

En resumen, el uso de MIPs permitió un pretratamiento simple, rápido y efectivo de muestras antes del análisis directo mediante técnicas de separación de alta resolución sin etapas adicionales de trabajo intensivo y demandante de tiempo. Su robustez y la posibilidad de reutilización, permiten que esta metodología se pueda utilizar como una herramienta para el monitoreo rutinario de PP en diversos PCP y muestras ambientales.

Además, el tratamiento de muestra propuesto utiliza una cantidad menor de disolventes orgánicos y en su lugar se usan reactivos amigables con el medio ambiente, siendo este un método de análisis verde para la separación y cuantificación de PP.

3.2. IMPRESIÓN MOLECULAR EN SUPERFICIE DE PARTÍCULAS DE SÍLICA GEL PARA LA EXTRACCIÓN SELECTIVA DE BENZILPARABENO EN PROTECTORES SOLARES Y MUESTRAS DE AGUA APLICANDO UN SISTEMA EN FLUJO

Los llamados contaminantes emergentes pueden definirse en términos generales como cualquier producto químico que no se monitorea comúnmente en el medio ambiente pero que tiene el potencial de causar efectos adversos en el medio ambiente o en la salud humana. Este grupo abarca compuestos que generalmente se usan en productos farmacéuticos y PCPs y por lo tanto que se acumulan progresivamente en los recursos naturales.

Los parabenos son ampliamente utilizados como conservantes y antimicrobianos, especialmente en cosméticos y productos de cuidado personal. Sin embargo, su producción

intensiva y uso masivo puede ocasionar su filtración al medio ambiente, convirtiéndolos en potenciales contaminantes emergentes [154].

Entre varios PCPs, los protectores solares se consideran una de las principales fuentes de liberación de parabenos al medio ambiente debido a la frecuencia de uso cada vez mayor en todo el mundo. Estos productos contribuyen a la contaminación de los océanos, lagos y ríos, lo que aumenta el riesgo para la salud humana debido a la elevada exposición. El análisis de contaminantes emergentes en los recursos hídricos exige el desarrollo de métodos precisos de preparación de muestras. Estos contaminantes generalmente se encuentran en concentraciones muy bajas en matrices que generalmente son de naturaleza compleja. Una metodología adecuada de tratamiento previo de la muestra debería mejorar la sensibilidad y la selectividad de todo el procedimiento analítico [140]. Para este propósito, en el presente trabajo se sintetizaron MIPs sobre la superficie de sílica gel lo que permitió mejorar la selectividad y propiedades mecánicas del MIP. La interacción dinámica que ofrece el sistema en flujo se optimizó para mejorar la retención selectiva del analito objetivo evitando la retención de análogos (Figura 3.15).

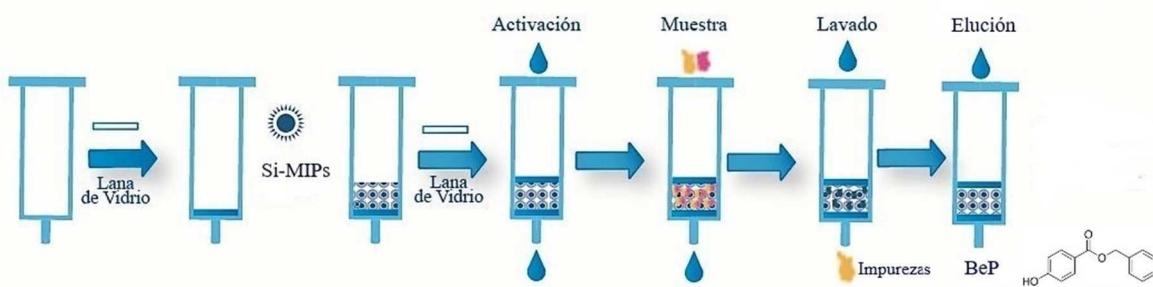


Figura 3.15. Representación esquemática del armado de la columna y procedimiento MISPE.

3.2.1. Síntesis del polímero y caracterización

Los Si-MIP se prepararon mediante polimerización en masa de acuerdo con el enfoque no covalente. Como molécula plantilla se seleccionó BeP, como monómero funcional, MAA, EGDMA fue elegido como reticulante y BPO se utilizó como iniciador radicalario. Para la selección de BPO, se tuvo en cuenta la facilidad para producir radicales libres por termo descomposición y su amplia disponibilidad. A la mezcla se le añadió también la sílica gel, se purgó con nitrógeno y se colocó en un baño de glicerina a 60°C durante 2 y 4 h para inducir la polimerización. Simultáneamente, se sintetizó un Si-NIP a modo de comparación.

Para la caracterización de los polímeros se utilizaron técnicas tales como, espectroscopia infrarroja de reflectancia (DRIFTS) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

La técnica DRIFTS se empleó para estudiar las estructuras químicas de los diferentes polímeros sintetizados. La banda observada a 1640 cm⁻¹ fue atribuida a la vibración de flexión del sustituyente hidroxilo en la superficie de la sílica gel (Fig 3.16 a). En la figura 3.16 (b y c) se muestra un espectro correspondiente a la superficie de la partícula de sílica modificada con el MIP (2 horas y 4 horas de síntesis respectivamente), mientras que en la figura 3.16 d se muestra el espectro del MIP (sin la adición de sílica).

En todos los espectros en los que se encuentra el polímero se pueden ver tres bandas fuertes a 1730, 1460 y 1380 cm⁻¹ (Fig 3.16 b, c y d). Estas bandas se atribuyeron a la vibración de estiramiento y flexión de metileno y metilo (Fig 3.17), la banda a 1730 cm⁻¹ indicó la existencia del grupo C = O, lo que confirma la existencia del polímero impreso sobre la superficie de las partículas de sílica.

La Figura 3.18 muestra imágenes SEM del polímero Si-MIP obtenidas cuando los tiempos de síntesis fueron 2 y 4 horas. El análisis SEM permitió estudiar la morfología, el tamaño y la porosidad de las partículas. Se observó que cuando la síntesis duró 4 horas (Fig 3.18 A2 y B2), la superficie se cubrió en mayor proporción que cuando la síntesis tuvo una duración de 2 horas (Fig 3.18 A1 y B1).

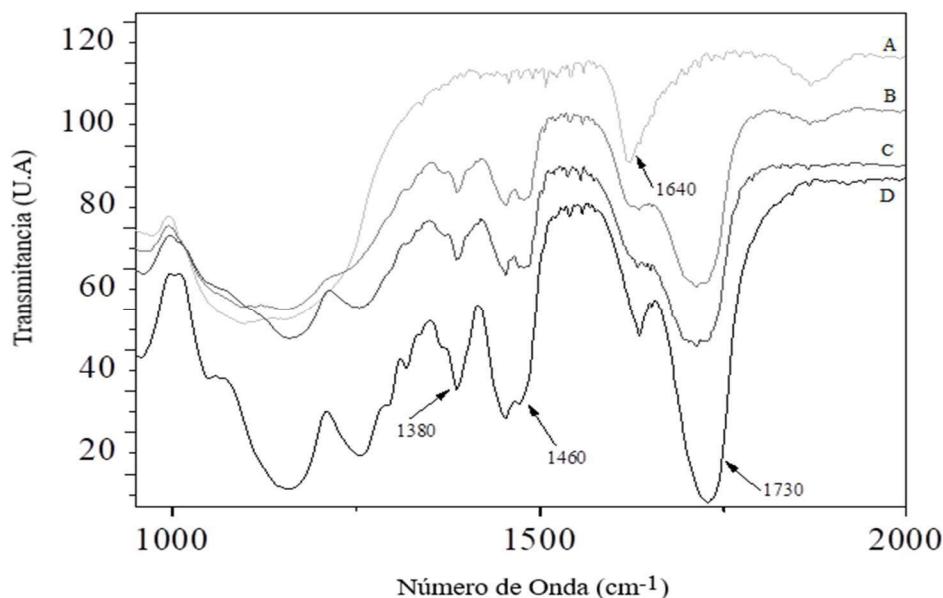


Figura 3.16. Espectros DRIFTS de partículas de sílice (A), Si-MIP 2h (B), Si-MIP 4h (C) y MIP (D).

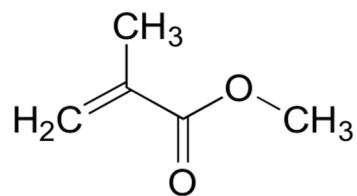


Fig 3.17. Estructura química del monómero funcional, metilmetacrilato con los grupos metileno y metilo que se observan en el espectro DRIFTS.

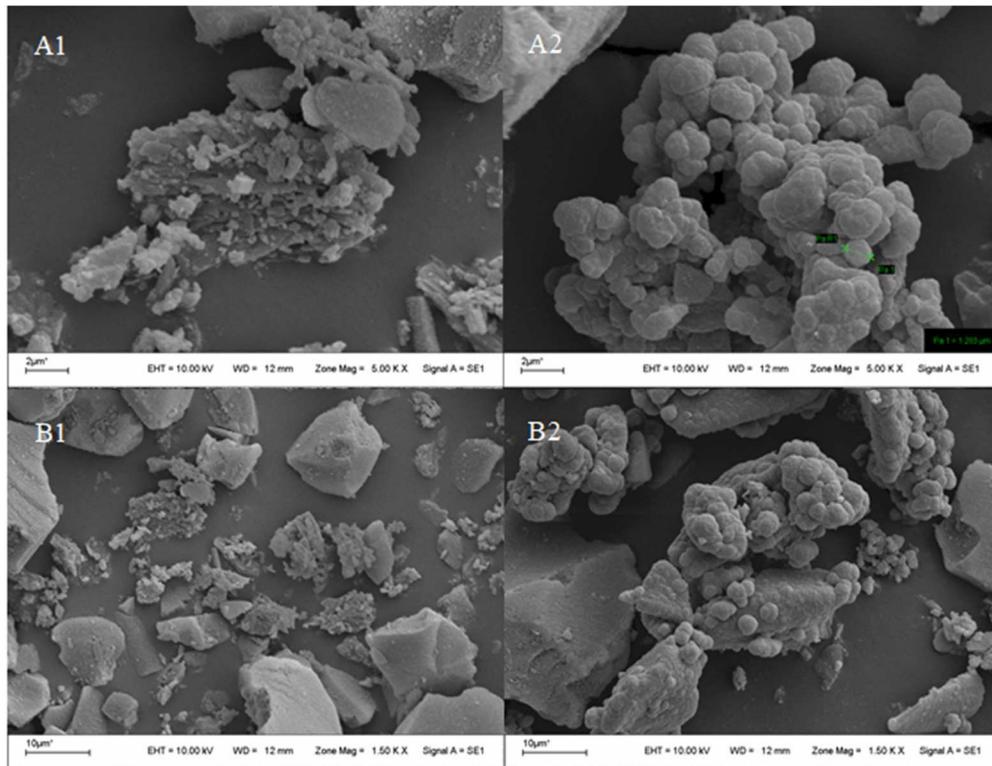


Figura 3.18. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A1-B1) polímero Si-MIP 2h y (A2-B2) polímero Si-MIP 4h. Fotografías A1 y A2 corresponde 5,00 KX, fotografías B1 y B2 corresponde 1,50 KX.

3.2.2. Evaluación del reconocimiento específico de los polímeros impresos, no impresos y de las partículas de sílica recubiertas (MIP, NIP, Si-MIP y Si-NIP)

Entre los numerosos análogos de parabenos, hemos seleccionado como molécula molde para la síntesis del polímero la molécula más grande de la serie (BeP). Se podría suponer que al usar BeP como plantilla, las cavidades generadas podrían albergar también a los análogos más pequeños. Para el estudio de reconocimiento específico, hemos comparado la capacidad de retención de los polímeros descritos previamente en un sistema en *batch*. Para

esto se preparó una solución estándar de BeP que contenía además cantidades (o concentraciones) similares de potenciales interferentes como MP y PP, y se prosiguió como se describe en la sección materiales y métodos.

En este estudio también se evaluó la naturaleza y composición de diversas soluciones utilizadas para la elución, resultando la mezcla etanol/agua 8:2 (v/v) la que demostró el mejor comportamiento de elución. El efecto de otros parámetros que influyen en la adsorción y desorción del analito tales como pH, tiempo de unión, cantidad de polímero y solvente de elución fue sistemáticamente evaluado y las condiciones experimentales que se seleccionaron luego de la optimización, se observan en la tabla 3.5.

El tiempo de interacción se evaluó dentro del intervalo de 1 a 25 minutos como se describe en la sección experimental. No se observaron cambios en el porcentaje de unión pasados los 5 minutos; por lo tanto, se seleccionaron 15 minutos para el estudio en *batch* con el fin de asegurar la máxima adsorción (Fig 3.19).

En el estudio de la cantidad de polímero necesaria para asegurar la adsorción total de BeP, se seleccionó como concentración de partida una cantidad de 10,00 mg. Posteriormente, se incrementó gradualmente la cantidad de polímero a utilizar, hasta que no se observó un aumento en la adsorción (Fig 3.20).

Las propiedades electrolíticas tales como el pH y la fuerza iónica tienen poco o ningún efecto sobre la interacción entre BeP y los polímeros. Esto responde al hecho, como se discutió anteriormente, de que los parabenos son compuestos no iónicos en el intervalo de pH estudiado (Figura 3.21).

	Intervalo estudiado	Valor Seleccionado
Tiempo de interacción (min)	1 - 25	15
Cantidad de polímero (mg)	10,00-40,00	20,00
pH del medio de interacción	5,00 - 9,00	NC
Volumen del solvente de elución (mL)	0,20-5,00	0,50

Tabla 3.5. Parámetros evaluados en el estudio en *batch*. Intervalos estudiados y valores optimizados del tiempo de interacción, la cantidad de polímero, el pH del medio de interacción y el volumen del solvente de elución. Soluciones estándar de MP, PP y BeP de concentración 0,02 mg mL⁻¹.

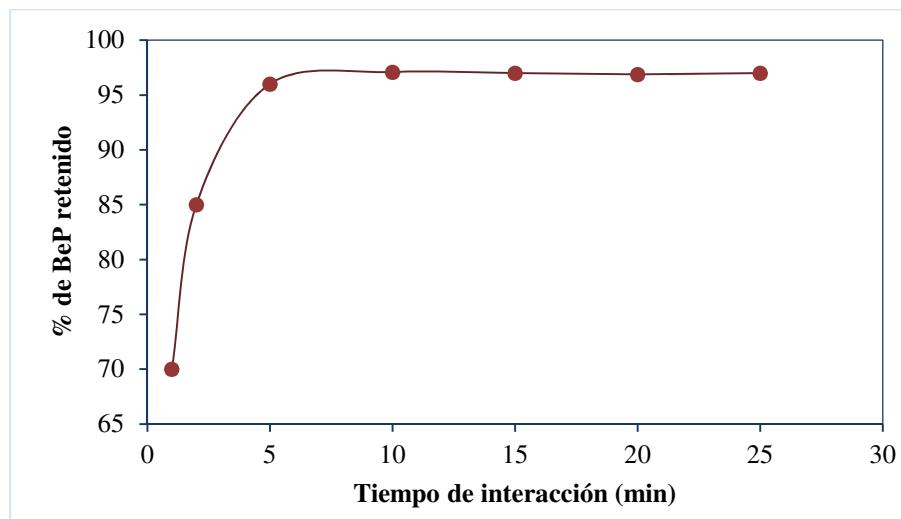


Figura 3.19. Optimización del tiempo de interacción. BeP retenido en función del tiempo de interacción.

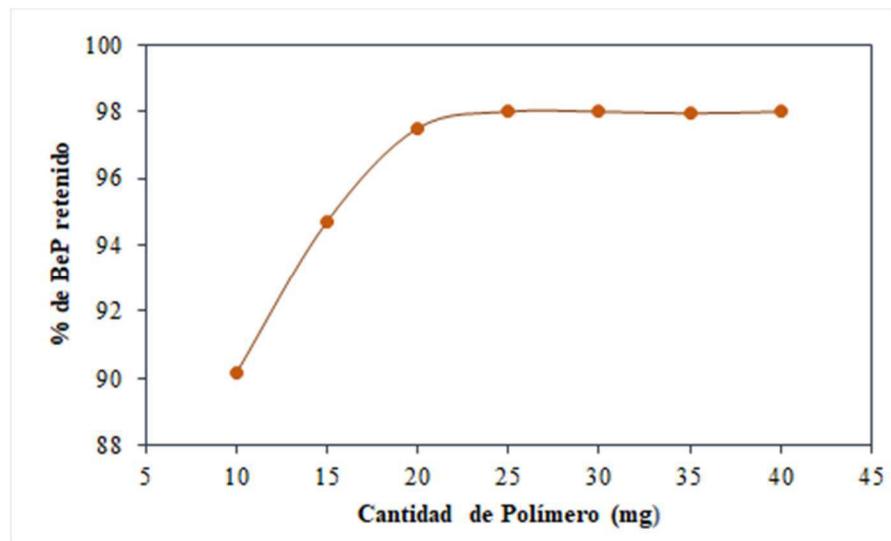


Figura 3.20. Estudio de optimización de la cantidad de polímero necesaria para lograr la máxima adsorción de BeP, porcentaje de BeP retenido en función de la cantidad de polímero.

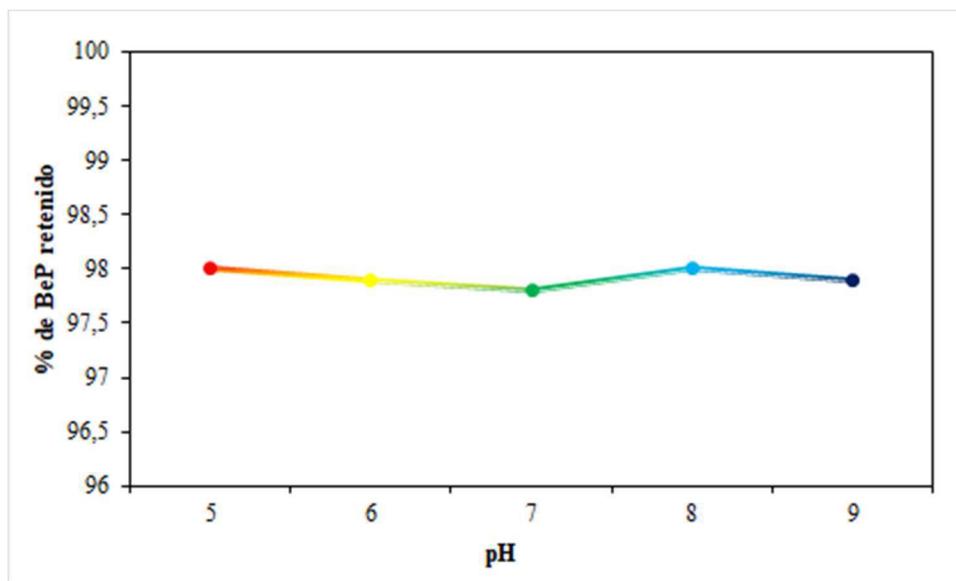


Figura 3.21. Estudio de la influencia del pH de la muestra sobre el porcentaje de BeP retenido por el polímero.

Con las condiciones experimentales optimizadas, el polímero que mostró el mejor rendimiento fue Si-MIP con una síntesis de 4hs de duración, expresado en términos de capacidad de retención. El porcentaje recuperado se muestra en la tabla 3.6, siendo 73,50, 40,30 y 85,50 para MP, PP y BeP, respectivamente. Por lo tanto, se eligió Si-MIP (4h) como material sorbente para las experiencias posteriores realizadas en el estudio de preconcentración en flujo.

En base a los resultados obtenidos en el estudio en *batch*, trabajamos en la adaptación del procedimiento a un sistema en flujo automatizado como se describió en la sección experimental.

La optimización del sistema en flujo para lograr la preconcentración del analito estudiado se llevó a cabo analizando en primer lugar la influencia de los parámetros ya evaluados en el estudio en *batch* y luego la influencia de: tiempo de muestreo, velocidad de flujo y perfil de elución. Los eluidos se recogieron en fracciones de 250 µL cada uno, y luego se analizaron mediante HPLC-DAD. A partir del cromatograma obtenido de la primera fracción, pudimos observar que más del 90% del BeP adsorbido se eluía junto con cantidades casi insignificantes de MP y PP. A partir de la segunda fracción de eluido recogido, se logró la desorción completa del BeP retenido sin la pérdida de selectividad, ya que las cantidades detectadas de MP y PP seguían siendo bajas.

Luego de estudiar la influencia de los parámetros mencionados sobre el sistema en flujo, el volumen del solvente de elución elegido fue de 500 µL (Fig 3.22), y la solución de elución seleccionada fué una mezcla de etanol/agua (8:2 v/v) con un caudal de 1,00 ml min⁻¹. Trabajando bajo estas condiciones experimentales, el cromatograma obtenido para el

análisis de BeP en presencia de niveles de concentración similares de MP y PP se muestra en la figura 3.23.

Comparando la capacidad de retención selectiva de los polímeros Si-MIP para BeP en un sistema en *batch* y flujo, concluimos que el último mostró una gran mejora debido a la retención casi nula de análogos como MP y PP (Tabla 3.6)

Recuperación (%) en un sistema <i>batch</i>			
	MP	PP	BeP
NIP	42,0	44,5	48,3
MIP	60,5	62,5	85,5
Si-NIP 2h	80,9	57,0	74,3
Si-NIP 4h	78,4	61,3	68,9
Si-MIP 2h	77,1	48,5	82,3
Si-MIP 4h	73,5	40,3	85,5
Recuperación (%) en un sistema en flujo			
Si-MIP 4h	0,59	11,0	85,5

Tabla 3.6. Estudio de capacidad de retención, expresado como % de recuperación de BeP para los diferentes polímeros, donde: MIP = Polímero de Impresión Molecular; NIP = polímero no impreso; Si-NIP (2 y 4 h) = sílice recubierta con polímero no impreso de 2 y 4 h de síntesis respectivamente; y Si-MIP (2 y 4 h) = sílice recubierta con polímero de Impresión Molecular de 2 y 4 h de síntesis respectivamente.

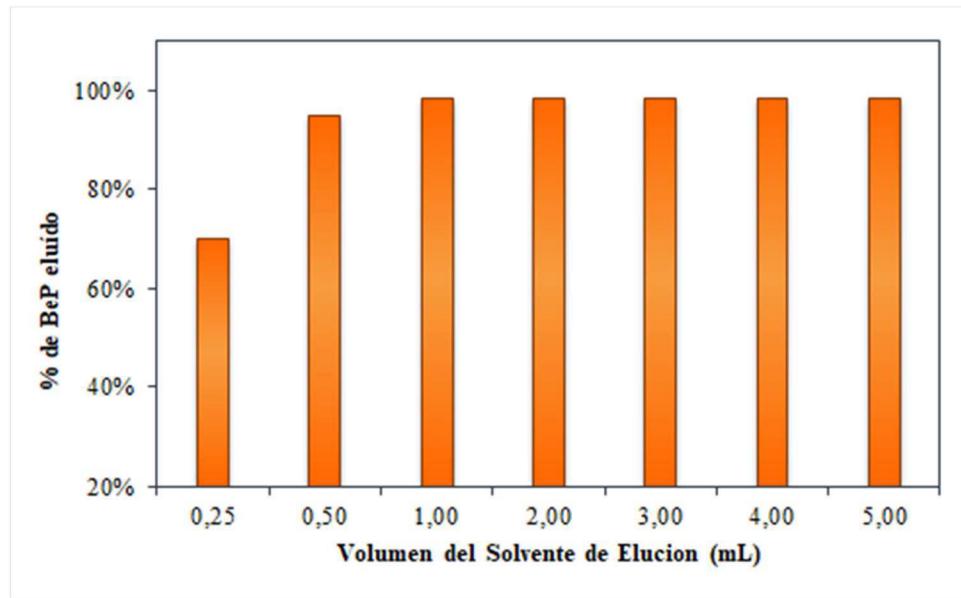


Figura 3.22. Optimización de la cantidad de solvente de elución. BeP eluido en función del volumen del solvente de elución empleado.

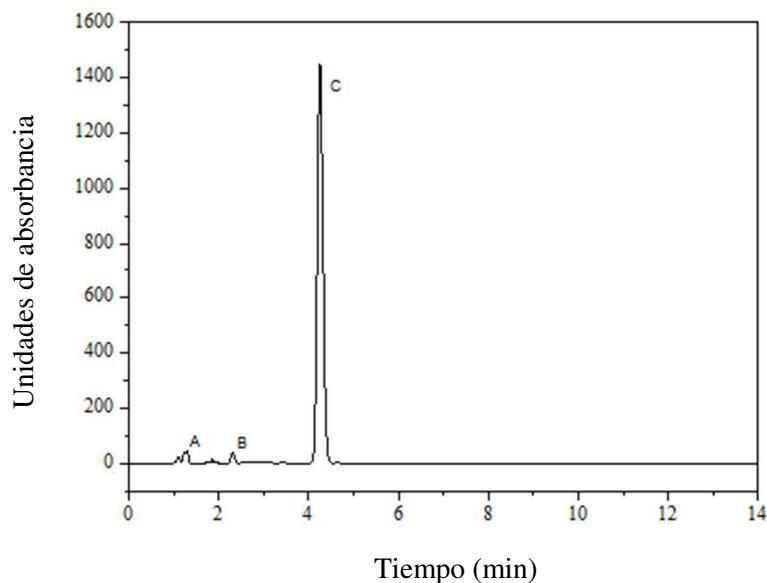


Figura 3.23. Cromatograma obtenidos a partir de la muestra de protector solar enriquecido con $0,25 \text{ mg g}^{-1}$ de MP, PP y BeP después del procedimiento SPE, donde: A) MP; B) PP; y C) BeP.

Por lo tanto, podemos concluir que el polímero Si-MIP sintetizado presenta cavidades específicas para la molécula objetivo (BeP). Además, al desarrollar el proceso como un sistema en flujo, la interacción dinámica entre las cavidades del polímero y la molécula objetivo evita la retención de análogos. Además, la metodología desarrollada presenta varias ventajas adicionales como permitir la síntesis de un producto polimérico con estabilidad química y física, una buena resistencia mecánica y robustez satisfactoria.

3.2.3. Parámetros de preconcentración

Extrínsecamente a la capacidad de unión de los polímeros, varios factores pueden afectar la eficacia de los MIPs cuando son utilizados en un sistema en flujo con el fin de preconcentrar selectivamente analitos. Para este propósito, se evaluaron algunos parámetros experimentales de preconcentración en flujo tales como velocidad de flujo, cantidad de polímero y tamaño de la columna. Se estudió la velocidad de flujo del disolvente de elución dentro del intervalo de $0,25\text{-}3,00 \text{ mL min}^{-1}$, no se observó una mejora significativa en la eficacia de extracción hasta $1,00 \text{ mL min}^{-1}$. Por lo tanto, se eligió un caudal de muestra/estándar de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ para el procedimiento de preconcentración (Fig 3.25).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio en *batch*, el intervalo estudiado para la cantidad de Si-MIP empaquetado en la columna de preconcentración fue de 10,00-40,00 mg. A partir de 20,00 mg se alcanzó la máxima capacidad de retención de BeP. Por lo tanto, se usaron 20,00 mg de Si-MIP como material de relleno para la columna de preconcentración.

El factor de recuperación (R%) se calculó de la siguiente manera:

$$R\% = (PFr / PFt) \cdot 100$$

Donde PFr es el factor de preconcentración real y PFt es el factor de preconcentración teórico, y se calcularon mediante:

$$PFr = Cf / Ci$$

Siendo Cf y Ci la concentración final y la concentración inicial respectivamente.

$$PFt = Vi / Vf$$

Siendo Vi y Vf el volumen inicial y el volumen final, respectivamente.

El R% obtenido después de aplicar el método de extracción fue de 85,50

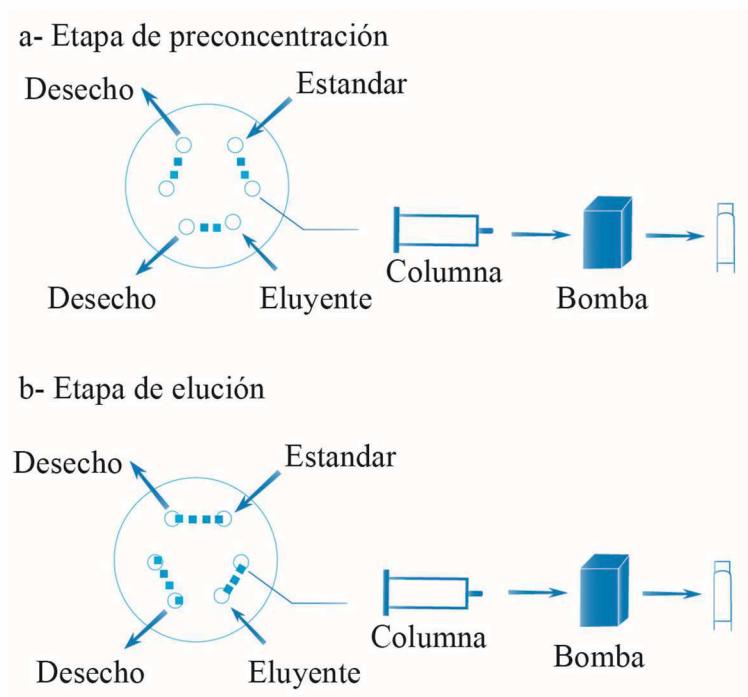


Figura 3.24. Esquema del instrumental utilizado en el proceso automatizado de preconcentración. Posición de la válvula durante las etapas de a) preconcentración y b) elución.

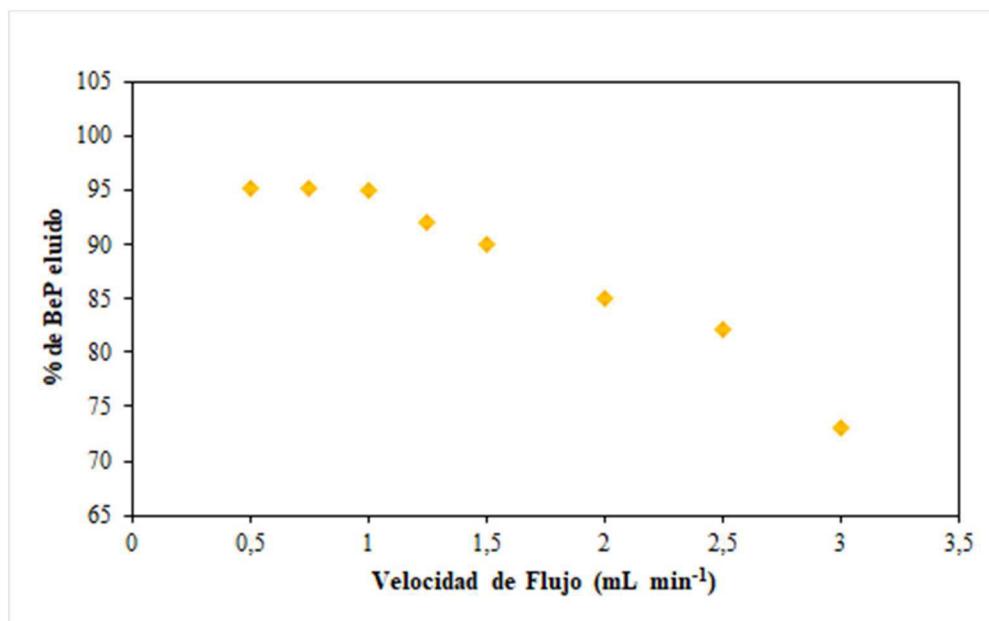


Figura 3.25. Influencia de la velocidad de flujo sobre la elución de BeP.

3.2.4. Validación

La validación analítica de esta metodología se realizó de acuerdo con las directrices internacionales de la ICH [147].

Para evaluar la linealidad de la metodología MISPE-HPLC- DAD, se prepararon soluciones estándar de BeP dentro del intervalo $1,11 \times 10^{-5}$ - $0,025$ mg mL⁻¹. Las áreas corregidas de los picos obtenidos se usaron para trazar la curva de calibración y la ecuación correspondiente se obtuvo mediante el método de regresión lineal. La curva de calibración resultante se comportó de manera lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas, con un coeficiente de regresión lineal (r^2) de 0,9998 (Tabla 3.7). El valor F calculado fue mayor que el valor crítico tabulado para un nivel significativo de 0,05 lo que muestra que el ajuste de regresión encontrado tiene una pendiente significativamente diferente de cero.

La exactitud, en términos de recuperación, se verificó al realizar el método de adición estándar y aplicar la metodología propuesta a muestras reales. Estas muestras consistieron en agua recogida de una piscina y una muestra de PCPs que no declaraba en su composición contener BeP. Ambas muestras fueron adicionadas con cantidades conocidas de BeP a seis niveles de concentración (n=6). En la Tabla 3.8 se puede ver que los valores de recuperación obtenidos van desde 99,61% al 101,8%, pudiendo estos resultados ser considerados satisfactorios en relación a la prueba de exactitud.

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se refiere a la variabilidad cuando el método es realizado por el mismo analista en un período de tiempo corto, mientras que la precisión intermedia se refiere a la precisión cuando uno o varios factores cambian en el método. En ambos casos, la precisión se expresó mediante desviaciones estándar relativas (RSD) de los tiempos de retención y las áreas de los picos corregidos. La repetibilidad de todo el procedimiento analítico se evaluó aplicando la metodología a 3 alícuotas de una misma muestra de protector solar (libre de PAs) adicionadas de 1,00 mg g⁻¹ de BeP y analizadas por triplicado en el mismo día mediante HPLC-DAD. Los valores de RSD obtenidos en la determinación de BeP fueron en todos los casos inferiores al 0,75 % para el tiempo de retención y al 1,31 % para el área del pico corregido (Tabla 3.9).

El estudio de precisión intermedia se realizó evaluando la reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo una variedad de condiciones: diferentes días de operación, analistas, instrumentos, soluciones y lotes de reactivos. La metodología se aplicó al análisis de la muestra de filtro solar adicionada con BeP al mismo nivel de

concentración durante tres días consecutivos, los valores de RSD obtenidos fueron 0,67 % para el tiempo de retención y 4,60 % para el área de pico corregida (Tabla 3.9).

La cantidad de estándar, que podía detectarse con una relación señal/ruido ≥ 3 , se consideró el límite de detección (LOD). El límite de cuantificación (LOQ) se calculó como la concentración de analito que puede determinarse con precisión y fiabilidad con una relación señal/ruido ≥ 10 . Tanto el LOD como el LOQ se evaluaron en base a la señal de fondo obtenida con el análisis de una solución estándar diluida de BeP ($n=6$). Para garantizar que el LOQ se cuantificó con una exactitud y precisión aceptable, se evaluó teniendo en cuenta la desviación estándar (Tabla 3.7). El LOD y LOQ obtenidos fueron $0,16 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ y $0,56 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, para las muestras de protector solar, mientras que para el análisis de agua de piscina fueron $3,34 \text{ ng mL}^{-1}$ y $11,16 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente.

Para investigar la capacidad de reutilización de los polímeros sintetizados, se realizaron 5 ciclos de adsorción/desorción por día. El procedimiento se llevó a cabo en las mismas condiciones que las descritas previamente y se repitió durante 5 días consecutivos. No se observaron diferencias apreciables en los resultados.

Muestra	Protector Solar ^a	Aqua de Piscina ^a
Intervalo Lineal	0,564 - 1250 $\mu\text{g g}^{-1}$	$1,11 \times 10^{-5}$ - 0,025 mg mL $^{-1}$
Ecuación de regresión	Pendiente 113 (3)	Pendiente 5713 (4)
	Ordenada al Origen 98,30 (3)	Ordenada al Origen 0,60 (3)
	r^2 0,99 (3)	r^2 0,999 (1)
Límite de detección (LOD) (n=3)	169 (5) ng g $^{-1}$	3 (4) ng mL $^{-1}$
Límite de cuantificación (LOQ) (n=3)	564 (6) ng g $^{-1}$	11 (5) ng mL $^{-1}$

Tabla 3.7. Validación del método con respecto a la linealidad, LOD, LOQ, para BeP en muestras de protector solar y agua de piscina.

^aEl valor expresado entre paréntesis corresponde a la desviación estándar.

Alícuotas ^a	Protector Solar ^b				Agua de Piscina		
	Base (mg g ⁻¹)	BeP adicionado (mg g ⁻¹)	BeP encontrado ^c (mg g ⁻¹)	Recuperación ±SD (%) ^d	BeP adicionado (mg mL ⁻¹)	BeP encontrado ^c (mg mL ⁻¹)	Recuperación ±SD (%) ^d
I	0,86	0,00	0,00	-	1,11x10 ⁻⁵	1,13x10 ⁻⁵	101,80 (2)
II	0,86	0,05	0,05	99,6 (5)	0,005	0,005	99,530 (5)
III	0,86	0,25	0,25	101,1 (5)	0,010	0,009	98,850 (5)
IV	0,86	0,50	0,49	98,6 (3)	0,015	0,014	99,930 (7)
V	0,86	1,00	1,00	100,39 (6)	0,020	0,020	100,200 (1)
VI	0,86	1,25	1,24	99,9 (3)	0,025	0,025	99,99 (6)

Tabla 3.8. Validación del método con respecto a la exactitud.

^aLas alícuotas de las muestras de filtro solar consistieron en 1 g del producto semisólido y 10,00 mL para las muestras de agua de piscina.

^bMuestra sin adición BeP.

^cConcentración de analito determinada luego de aplicar el procedimiento descripto.

^dPorcentaje de recuperación (n = 3): [(Valor encontrado - valor base) / agregado] x 100.

	RSD para el Tiempo de Retención (%)	RSD para el Área de Pico Corregida (%)
Repetibilidad (día 1)	0,75	1,31
Repetibilidad (día 2)	0,65	0,17
Repetibilidad (día 3)	0,72	0,33
Precisión intermedia (entre días)	0,67	4,60

Tabla 3.9. Repetibilidad y Precisión intermedia modificando el día de operación, valores de RSD (%) correspondientes al Tiempo de Retención y Área de pico corregida de BeP.

3.2.5. Conclusión

Esta metodología presenta ventajas en términos de selectividad, sensibilidad, robustez y bajo costo en comparación con los métodos preexistentes para la determinación de BeP en muestras de agua potencialmente contaminadas y PCP.

El paso de preconcentración en un sistema de flujo automatizado desarrollado en este trabajo permitió una extracción selectiva de la molécula objetivo. Asimismo, proporciona una determinación sensible al nivel de trazas con exactitud y precisión satisfactorias.

La aplicación de esta metodología contribuye a disminuir o eliminar el uso de solventes orgánicos durante la extracción de parabenos, por lo que puede considerarse un método amigable con el medio ambiente.

La eliminación de etapas de tratamiento de muestra y la automatización de la metodología, aportan rapidez en el análisis y disminuyen la posibilidad de errores. Además, el

instrumental necesario es relativamente simple y de uso habitual en los laboratorios analíticos como HPLC-DAD. Esto, sumado al hecho de la elevada resistencia mecánica que presenta el sorbente después de ciclos repetidos de uso permite su aplicación como un control de calidad rutinario de los conservantes y el control ambiental de contaminantes emergentes.

**3.3. DETERMINACIÓN SELECTIVA DE BUTILPARABENO EN PCPS
UTILIZANDO UN SENSOR ELECTROQUÍMICO MODIFICADO
MEDIANTE LA DEPOSICIÓN DE UNA PELÍCULA DE SILOXANO CON
IMPRESIÓN MOLECULAR (MIS)**

El desarrollo de métodos confiables, rápidos, sensibles y simples para la cuantificación de BuP es de gran importancia. Sobre la base de estos aspectos, este compuesto se usó como plantilla para el desarrollo de un sensor con impresión molecular.

Recientemente, las AuNPs han llamado la atención en su utilización para mejorar la sensibilidad de la detección electroquímica. Sin embargo, hasta ahora, solo hay unos pocos trabajos que informan el uso de AuNPs para sensores basados en impresión molecular.

Con el fin de mejorar la sensibilidad del sensor, se electrodepositaron AuNPs sobre un GCE para luego sintetizar sobre estas un MIS. El objetivo en el uso de AuNPs fue aumentar el área de superficie, mejorar la capacidad de adsorción, para luego acoplar el MIS. La combinación de AuNPs con la técnica sol-gel ofrece una ruta atractiva para mejorar la sensibilidad y la estabilidad del sensor impreso.

3.3.1. Preparación y modificación del electrodo de trabajo

En primer lugar, se realizó la electrodeposición de AuNPs sobre la superficie de un GC como se mencionó en la sección de procedimientos. A continuación, para promover la adhesión de la película MIS a la superficie de las AuNPs, el electrodo GC/AuNPs se sometió a inmersión en una solución de 3-MPTS, para formar una capa en la superficie mediante enlaces de Au-S entre los átomos de oro y los grupos tioles (-SH) del 3-MPTS. La capa de 3-MPTS se usó como interfaz entre la superficie de las AuNPs y la película MIS. Uno de los factores importantes para una impresión molecular exitosa es la presencia de monómeros funcionales en la matriz polimérica. El papel de los monómeros es ayudar en la creación de la cavidad de unión específica mediante la exposición de los grupos químicos en una posición óptima para que luego puedan interactuar con el analito de interés en los procesos de unión. La película MIS se fabricó mediante el proceso sol-gel [155] e involucró reacciones de hidrólisis/condensación de PTEOS, TEOS y APTMS en presencia de BuP.

En las condiciones de unión (rebinding), se favorece la formación de enlaces $\pi - \pi$ entre el grupo fenilo de PTEOS y el anillo aromático de BuP. TEOS actuó como reticulante para formar una red polimérica con alta rigidez alrededor de la plantilla. Al utilizar este compuesto como reticulante, se favorece la formación de enlaces puente hidrógeno, entre los grupos C=O de la molécula de BuP y los grupos -OH aportados por TEOS. Se espera

que una distribución espacial específica de grupos no funcionales en la superficie de la película MIS maximice la interacción reversible entre la superficie del sensor y la plantilla.

El etoxietanol se usó como disolvente en este experimento porque tenía mejores propiedades de solvatación y menor tasa de evaporación que el etanol, que es el disolvente más comúnmente usado en el proceso de sol-gel. El grosor promedio de la película MIS fue de 70 nm.

3.3.2. Comportamiento electroquímico de BuP en el sensor impreso

En la figura 3.X se muestran los voltamogramas de SW obtenidos con GC/AuNPs-MIS antes y después de la etapa de lavado con una solución de ácido acético/metanol (1:9) (curvas 1 y 2). Esta solución se eligió como solución de lavado porque resultó ser un buen disolvente para el analito y podría inducir a la molécula plantilla a dejar intactos los sitios impresos en la matriz polimérica. Es posible confirmar la eficacia de la extracción debido a la desaparición completa del pico anódico a +1,10 V después de 5 pasos de lavado. Las respuestas voltamétricas obtenidas con el GC/AuNPs-MIS antes (curva 1) y después del proceso de lavado (curva 2) y la re-adsorción (curva 3) se presenta en la figura 3.26. Como era de esperar, de la misma manera que se preparó el GCE/AuNPs-MIS, se sintetizó el GCE/AuNPs-NIS (sin molécula molde), el cual no mostró ningún pico de oxidación. La capacidad de re-adsorción de GCE/AuNPs-MIS y GCE/AuNPs-NIS se investigó mediante experimentos de SWV. Después de incubar durante 20 minutos en una solución de BuP de 0,01 mol L⁻¹, preparada en etanol/agua 2:8 (v/v), el GCE/AuNPs-MIS fue el único que exhibió un pico anódico a +1,10 V correspondiente a moléculas de BuP reconocidas en la superficie del sensor. Para el caso del GCE/AuNPs-NIS se repitió el mismo procedimiento,

y no mostró un pico anódico después de la incubación. La capacidad de unión del GCE/AuNPs-MIS hacia las moléculas de BuP podría asignarse a la organización de los grupos funcionales que rodean a la molécula plantilla en la película del MIS. La interacción entre los grupos funcionales y la plantilla define el tamaño y la orientación de los grupos funcionales de la cavidad impresa, creando así una cavidad funcionalizada específica para el proceso de unión. Además, se espera que la película no impresa sea menos porosa que la película impresa, ya que no se utiliza en su síntesis la molécula plantilla. La porosidad mejora la difusión de BuP en la película y puede promover la unión dentro de la película, permitiendo la concentración selectiva del analito.

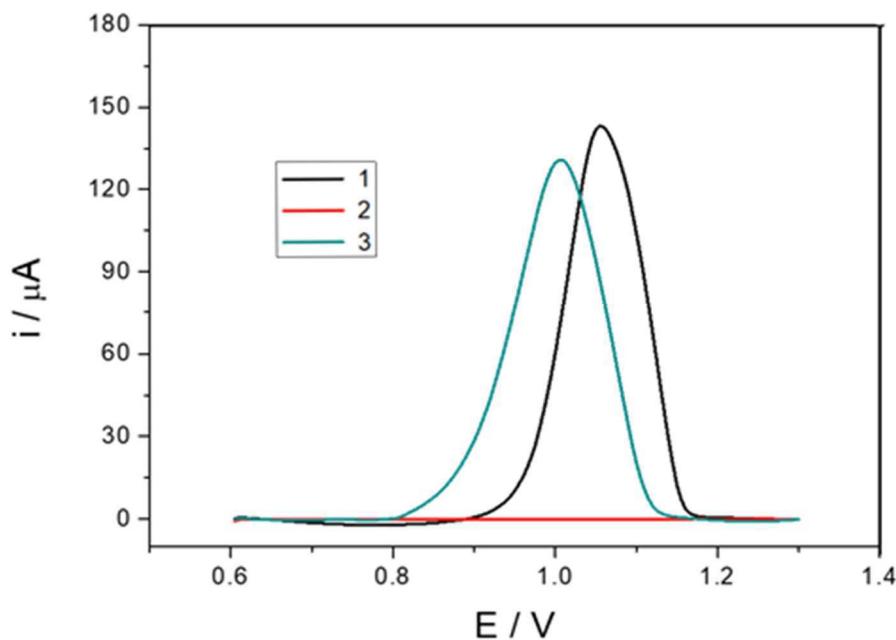


Figura 3.26. Voltamogramas onda cuadrada obtenidos con GCE/AuNPs-MIS en H_2SO_4 ($1,00 \text{ mol L}^{-1}$) conteniendo la molécula plantilla (1), después de la desorción de la molécula molde (2) y después de 20 minutos de interacción (3) con una solución de BuP ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) etanol/agua 2:8 (v/v) vs Ag/AgCl, NaCl (3 mol L^{-1}).

3.3.3. Optimización de las condiciones analíticas para la determinación de BuP

3.3.3.1. Influencia del tiempo de incubación

El tiempo de incubación del sensor es un parámetro muy importante que debe estudiarse para determinar la mejor sensibilidad en las mediciones. Por lo tanto, el tiempo de incubación se evaluó de 5 a 60 minutos por la técnica de SWV, en una solución patrón de BuP 0,01 mol L⁻¹ en etanol/H₂O 2:8 (v/v). Las corrientes de pico anódicas aumentaron gradualmente con el tiempo de incubación, lo que sugiere un aumento de la cantidad de moléculas de BuP adsorbidas en el GCE/AuNPs-MIS. Sin embargo, la respuesta del sensor alcanza un valor aproximadamente constante cuando el tiempo de incubación es de 20 minutos, lo que indica que la unión de moléculas de BuP en los sitios específicos de la película MIS tiende a un estado de equilibrio. En este sentido, se eligió un tiempo de incubación de 20 minutos para los experimentos posteriores.

3.3.3.2. Influencia del solvente de incubación

La alta selectividad del sensor se debe principalmente a la formación de una cavidad específica para un analito en particular. Existen diferentes variables que afectan la unión del analito a esta cavidad entre las que se pueden nombrar, la naturaleza del solvente utilizado para establecer la interacción, el pH, el tiempo y modo de contacto, entre otras. La capacidad de unión del sensor se evaluó poniendo en contacto el MIS con estándares de BuP preparados en varios medios de disolución a distintos pH, para estos se utilizó buffer

acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 2,00; etanol/agua 2:8 (v/v) pH 7,00 y PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 10,00 (Fig 3.27).

En base a los resultados obtenidos luego de incubar el sensor en los diferentes medios, concluimos que utilizando una mezcla etanol/agua 2:8 (v/v) pH 7,00 como solvente de incubación se obtienen picos más definidos con un menor ancho de pico.

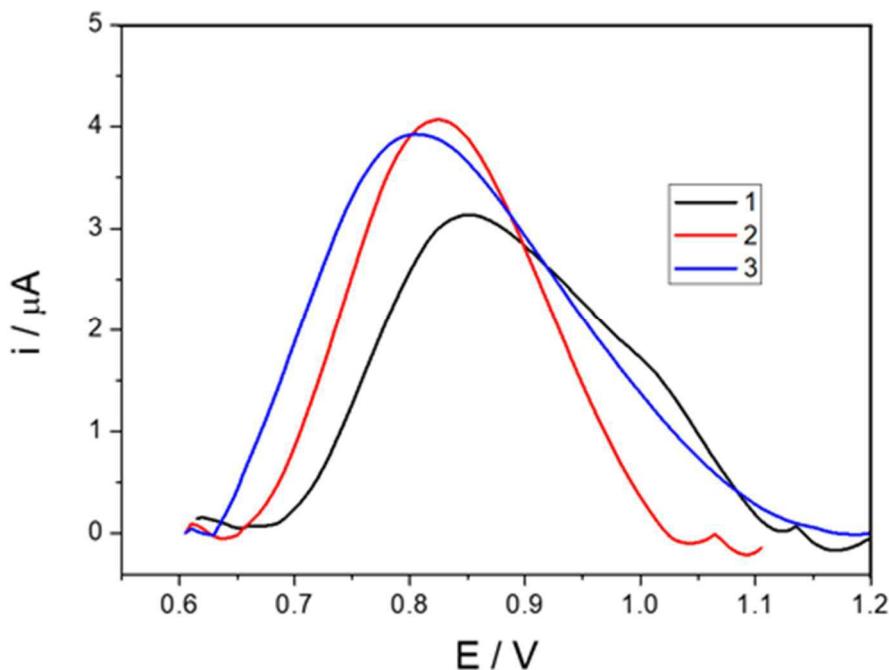


Figura 3.27. Voltamogramas de onda cuadrada obtenidos con un GCE/AuNPs-MIS después de un tiempo de interacción de 20 minutos con una solución de BuP 0,01 mol L⁻¹ en diferentes medios, buffer acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 2,00 (1), etanol/agua 2:8 (v/v) pH 7,00 (2) y PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 10,00 (3) vs Ag/AgCl, NaCl (3 mol L⁻¹).

3.3.3.3. Influencia de los diferentes medio de medida

Con el fin de utilizar el GCE/AuNPs-MIS para la determinación de BuP en muestras reales, la optimización del procedimiento analítico se llevó a cabo con un estudio sistemático de los parámetros experimentales que afectan la respuesta del sensor. En este sentido, la influencia de los diferentes electrolitos en la respuesta del sensor se probó en tres soluciones diferentes (H_2SO_4 1,00 mol L⁻¹ pH 2,50 y PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,00 y 10,00). La solución de H_2SO_4 produce la mejor respuesta y se eligió para los experimentos siguientes, (Fig 3.28).

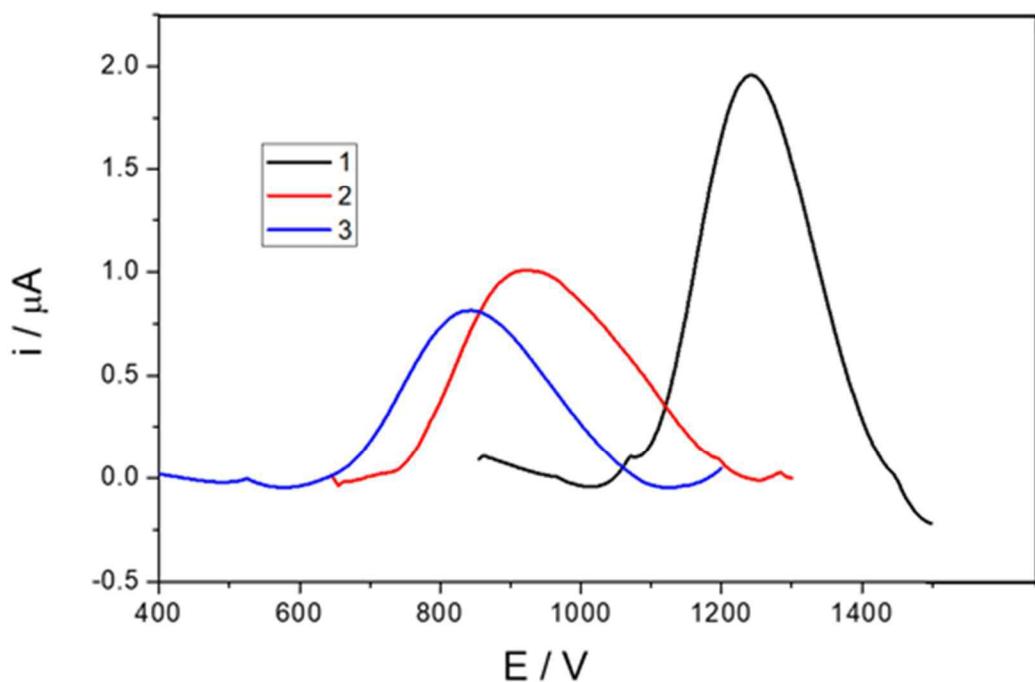


Figura 3.28. Voltamogramas onda cuadrada obtenidos con un GCE/AuNPs-MIS para la determinación de BuP en diferentes medios, (1) en H_2SO_4 1,00 mol L⁻¹ pH 2,50, (2) PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,00 y (3) PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 10,00.

3.3.3.4. Parámetros analíticos

Para la obtención de la curva de calibrado del sensor desarrollado, se llevaron a cabo las determinaciones de BuP a diferentes concentraciones ($n=5$) en una solución de H_2SO_4 1,00 mol L⁻¹ por SWV después de optimizar las condiciones analíticas (Fig 3.29 (A)). El GCE/AuNPs-MIS mostró un rango de respuesta lineal de $6,25 \cdot 10^{-5}$ a $1,25 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Fig 3.29 (B)), que se puede expresar de acuerdo con la siguiente ecuación: $i_p (\mu\text{A}) = 0,0152 [BuP] (\text{mol L}^{-1}) - 3,00 \cdot 10^{-7}$, con un R^2 de 0,994. Se determinó un LOD de $2,05 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ y un LOQ de $6,25 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹. La estabilidad del GCE/AuNPs-MIS se verificó realizando 30 mediciones por SWV sucesivas para 0,01 mol L⁻¹ BuP en las condiciones analíticas optimizadas y no se observó ningún cambio en la respuesta del sensor. La desviación estándar relativa (RSD) de las corrientes de pico anódicas fue de 3,2%. Además, el tiempo de vida del sensor se verificó al realizar mediciones por SWV para 0,01 mol L⁻¹ BuP a lo largo de 5 días. Incluso cuando se almacenó a temperatura ambiente, no se observó ningún cambio significativo en la respuesta durante el tiempo de trabajo. Estos resultados indican la estabilidad satisfactoria del sensor desarrollado, que podría estar bien asignado a la estructura rígida de la película MIS sobre el GCE/AuNPs. Estos resultados indicaron que el sensor tiene una buena estabilidad y repetibilidad, probablemente debido a la excelente rigidez física, la resistencia química y las propiedades de estabilidad térmica de la película MIS.

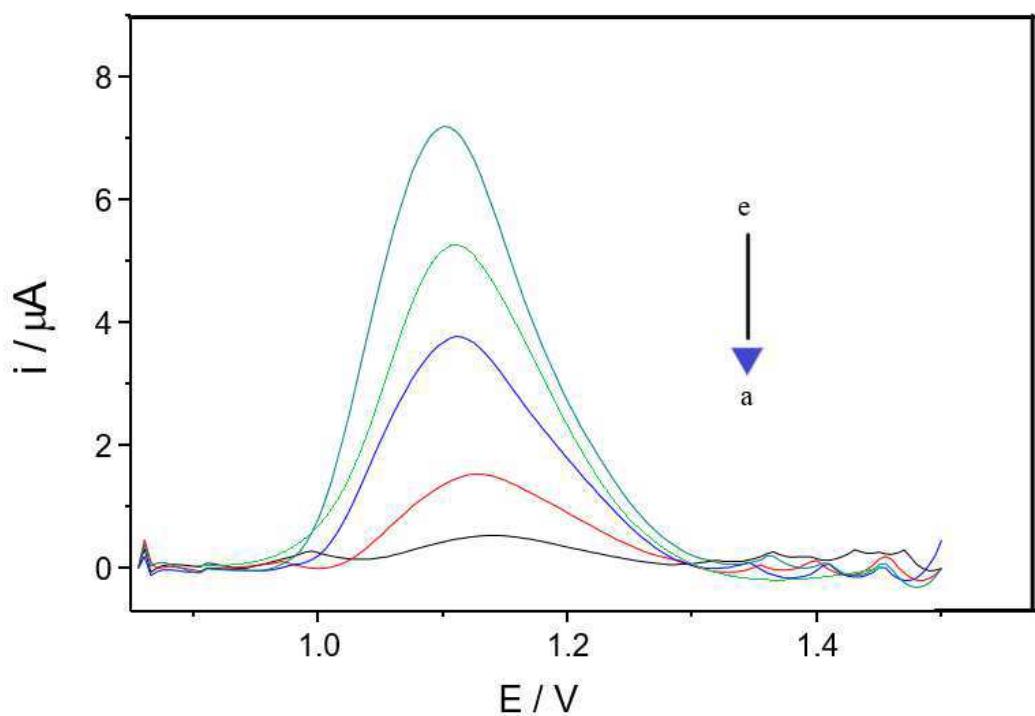


Figura 3.29. (A) Voltamogramas de onda cuadrada obtenidos con un GCE/AuNPs-MIS para la electrooxidación de BuP a distintos niveles de concentración en condiciones optimizadas.

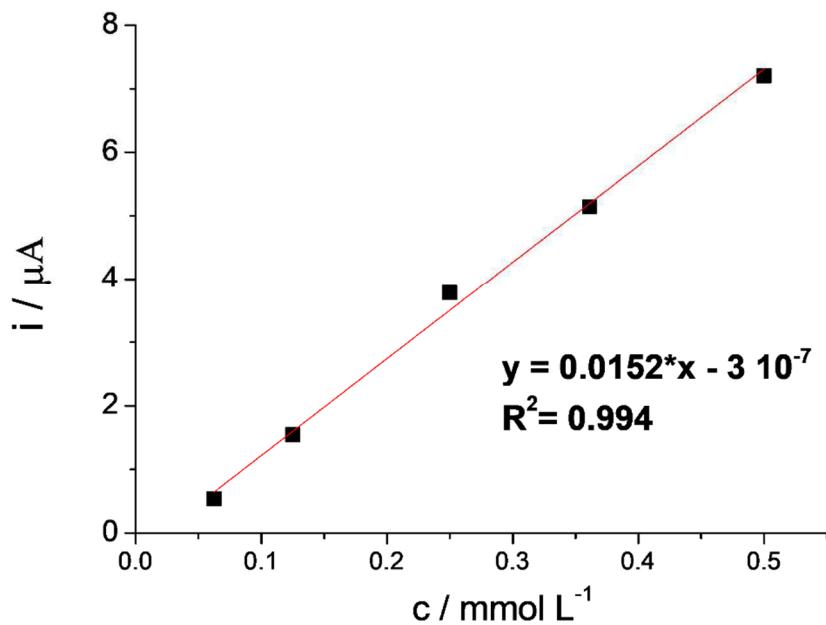


Figura 3.29. (B) Curva de calibración: $i_p (\mu\text{A}) = 0,0152 [\text{BuP}] (\text{mol L}^{-1}) - 3,00 \times 10^{-7}$.

Tiempo de incubación: 20 minutos. Electrolito soporte: H_2SO_4 1,00 mol L^{-1} , amplitud de la onda cuadrada: 60 mV, salto de potencial, 6 mV y frecuencia de la onda cuadrada: 15 Hz.

3.3.4. Aplicación del sensor GCE/AuNPs-MIS en muestras reales

Se evaluó la eficacia de este sensor para la extracción de BuP de líquidos de toallitas para limpieza facial que contienen fragancias, humectantes, conservantes y otros ingredientes cosméticos. Además, se aplicó la metodología a una muestra de agua micelar que no declaraba en su composición BuP. El estudio se aplicó a las muestras luego de su acondicionamiento, tal como se explica en la sección materiales y métodos, y se analizaron mediante la técnica electroanalítica moderna SWV.

Luego de aplicar la metodología, pudo detectarse en la muestra de toallitas faciales una concentración de BuP de $1,76 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} sin la presencia de interferentes. Así mismo, en

la muestra de agua micelar, no se detectó la presencia de BuP, en concordancia con lo indicado en su envase (Fig 3.30).

La exactitud se evaluó a través de un estudio de recuperación, para el cual la muestra libre de PAs fue adicionada de diferentes concentraciones de BuP ($n=6$) las mismas se encontraron dentro del intervalo de 95,3% a 103,9% lo que indica que el sensor desarrollado tuvo una buena exactitud, sin influencia de la matriz pudiendo ser aplicado al análisis de muestras reales.

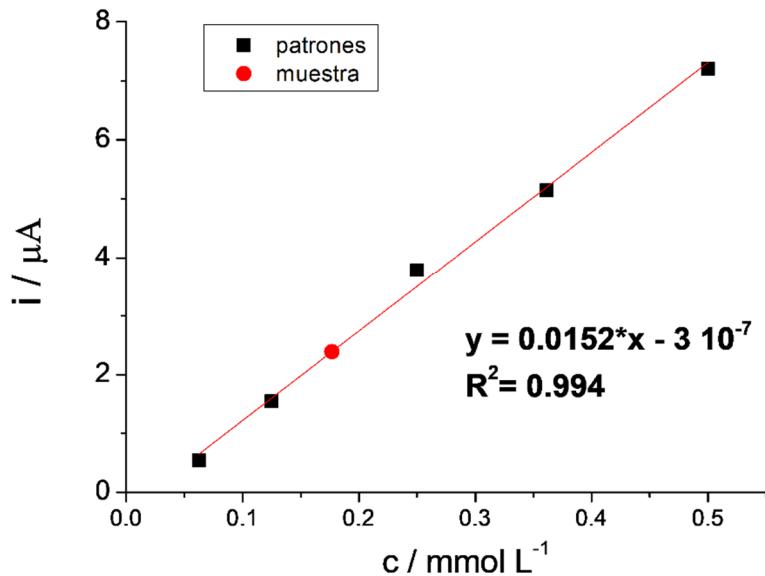


Figura 3.30. Curva de calibración: $i_p (\mu\text{A}) = 0,0152 [\text{BuP}] (\text{mol L}^{-1}) - 3,00 \times 10^{-7}$ y determinación de la concentración de BuP en toallitas de limpieza facial, concentración calculada $1,76 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Tiempo de incubación: 20 minutos. Electrolito soporte: H₂SO₄ 1,00 mol L⁻¹, amplitud de la onda cuadrada: 60 mV, velocidad de barrido, 6 mV. s⁻¹ y frecuencia de la onda cuadrada: 15 Hz.

3.3.5. Estudio de interferencias

Con el fin de verificar la viabilidad del método propuesto en relación con la selectividad de la película MIS sobre la superficie de las AuNPs, se colocó el electrodo modificado GCE/AuNPs-MIS en diferentes soluciones de analitos con estructuras análogas a la del BuP en una concentración de 0,01 mol L⁻¹. Para este estudio, seleccionamos como potenciales interferentes a MP y PP, ambos compuestos utilizados en combinación con BuP en diversas muestras cosméticas. Así mismo, con el objetivo de evaluar la selectividad aplicando el sensor a una muestra real, se seleccionó una muestra de toallitas para limpieza facial que contenía dos compuestos análogos a BuP. De acuerdo con la figura 3.31, se puede observar que tanto PP como MP representan una interferencia de la señal menor al 15% con respecto a la señal de BuP. Por lo tanto, se obtuvo una selectividad satisfactoria de BuP por el sensor propuesto.

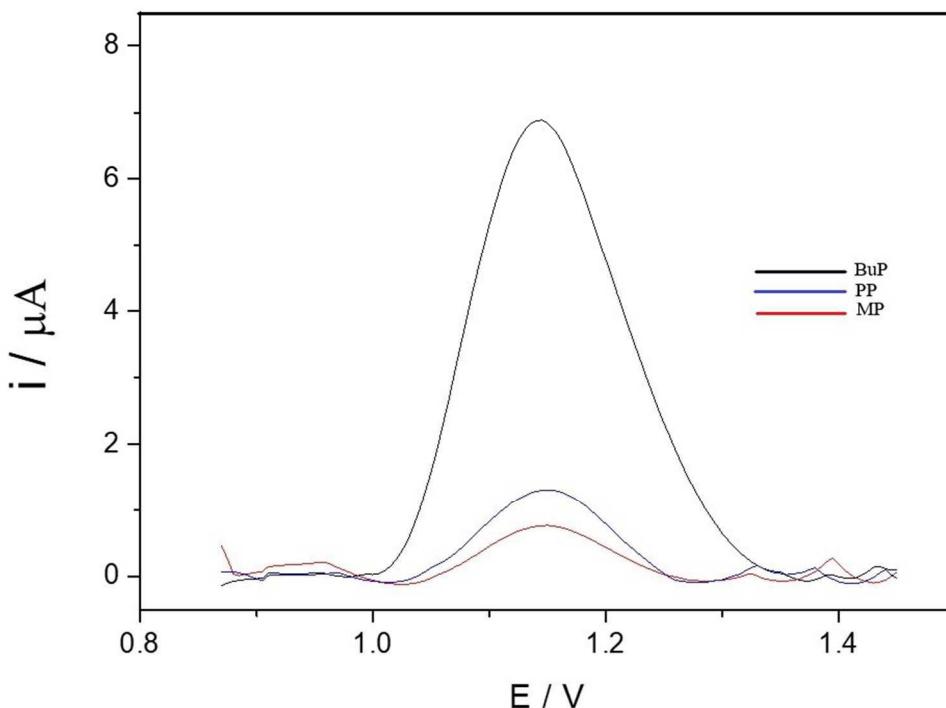


Figura 3.31. Voltamogramas de onda cuadrada obtenidos con un GCE/AuNPs-MIS para la determinación de BuP en presencia de PP y MP 0.01 mol L^{-1} . Tiempo de incubación: 20 minutos. Electrolito soporte: $\text{H}_2\text{SO}_4 1,00 \text{ mol L}^{-1}$, amplitud de la onda cuadrada: 60 mV, salto de potencial, 6 mV y frecuencia de la onda cuadrada: 15 Hz.

3.3.6. Conclusión

En este estudio, la molécula molde de BuP se imprimió con éxito en una capa de siloxano, obtenida por el proceso sol-gel, en la superficie de un electrodo de GC sobre el cual se habían electrodepositado AuNPs, para luego ser utilizado como sensor electroquímico. El excelente desempeño del sensor se debió a las interacciones entre el analito y los grupos funcionales en la superficie de la capa de siloxano, además del tamaño de las cavidades, que promovieron el entorno apropiado para la interacción de las moléculas de BuP. Bajo las

condiciones analíticas seleccionadas, la corriente pico anódica fue lineal para concentraciones de BuP que variaron de $6,25 \cdot 10^{-5}$ a $1,25 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, con un LOD $2,05 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹. El sensor electroquímico mostró una alta selectividad, sensibilidad y velocidad, adecuada para la detección de BuP, incluso en el análisis de muestras que contenían estructuras análogas.

Referencias Capítulo 3

- [140] H.-Y. Shen, H.-L. Jiang, H.-L. Mao, G. Pan, L. Zhou, and Y.-F. Cao, “Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods.,” *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 1, pp. 48–54, Jan. 2007.
- [141] J. Šafra and M. Pospíšilová, “Separation and determination of ketoprofen, methylparaben and propylparaben in pharmaceutical preparation by micellar electrokinetic chromatography,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008.
- [142] J. Regueiro, E. Becerril, C. Garcia-Jares, and M. Llompart, “Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 23, pp. 4693–4702, Jun. 2009.
- [143] L. Núñez, E. Turiel, A. Martin-Esteban, and J. L. Tadeo, “Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection.,” *Talanta*, vol. 80, no. 5, pp. 1782–8, Mar. 2010.
- [144] D. A. Spivak, “Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 12, pp. 1779–1794, 2005.
- [145] M. Contin, S. Flor, M. Martinefski, S. Lucangioli, and V. Tripodi, “The use of coenzyme Q0 as a template in the development of a molecularly imprinted polymer for the selective recognition of coenzyme Q10,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 807, pp. 67–

74, Jan. 2014.

- [146] M. Thommes *et al.*, “Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 87, no. 9–10, Jan. 2015.
- [147] “ICH, 2005. Q2 (R1), ‘Validation of analytical procedures: text and methodology’, ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Chicago, USA, 2005.”
- [148] H. Çabuk, M. Akyüz, and Ş. Ata, “A simple solvent collection technique for a dispersive liquid-liquid microextraction of parabens from aqueous samples using low-density organic solvent,” *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 19, pp. 2645–2652, Oct. 2012.
- [149] M. Moradi and Y. Yamini, “Application of vesicular coacervate phase for microextraction based on solidification of floating drop,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1229, pp. 30–37, Mar. 2012.
- [150] B. Ebrahimpour, Y. Yamini, and A. Esrafili, “Emulsification liquid phase microextraction followed by on-line phase separation coupled to high performance liquid chromatography,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 751, pp. 79–85, Nov. 2012.
- [151] M. Díaz-Álvarez, E. Turiel, and A. Martín-Esteban, “Hollow fibre liquid-phase microextraction of parabens from environmental waters,” *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 93, no. 7, pp. 727–738, Jun. 2013.
- [152] B. Czarczyńska-Goślińska, A. Zgoła-Grześkowiak, M. Jeszka-Skowron, R.

- Frankowski, and T. Grześkowiak, “Detection of bisphenol A, cumylphenol and parabens in surface waters of Greater Poland Voivodeship,” *J. Environ. Manage.*, vol. 204, no. Pt 1, pp. 50–60, Dec. 2017.
- [153] M. C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, and M. Valcárcel, “Determination of parabens in waters by magnetically confined hydrophobic nanoparticle microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry,” *Microchem. J.*, vol. 110, pp. 643–648, Sep. 2013.
- [154] D. Lopes, A. N. Dias, V. Simão, and E. Carasek, “Determination of emerging contaminants in aqueous matrices with hollow fiber-supported dispersive liquid-liquid microextraction (HF-DLLME) and separation/detection by liquid chromatography – Diode array detection,” *Microchem. J.*, vol. 130, pp. 371–376, Jan. 2017.
- [155] A. Kłoskowski, M. Pilarczyk, W. Chrzanowski, and J. Namieśnik, “Sol-Gel Technique. A Versatile Tool for Adsorbent Preparation,” *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 40, no. 3, pp. 172–186, Jul. 2010.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El presente trabajo de tesis se basó en el desarrollo de sistemas analíticos con dos enfoques principales:

- Investigar técnicas de pretratamiento de muestra para la separación y preconcentración de compuestos de interés, haciendo especial hincapié en la simplificación de los procedimientos, reducción de la utilización de agentes contaminantes y disminución de los tiempos de análisis.
- Trabajar en la modificación de electrodos para la detección selectiva a través de técnicas electroquímicas con el objeto de lograr el desarrollo de metodologías analíticas innovadoras

Ambos enfoques se aplicaron al análisis de PAs en productos cosméticos con el objeto de mejorar dos parámetros claves de las metodologías analíticas, la selectividad y sensibilidad.

En una primera etapa se diseñó y sintetizó un MIP capaz de reconocer selectivamente a PP lo que permitió su extracción desde una matriz compleja como son los PCPs. La importancia de este estudio radica en que PP se encuentra asociado a compuestos análogos en las presentaciones comerciales utilizadas por la población. Aplicando esta metodología se logró una muy buena sensibilidad lo que permitió estudiar su utilidad para el análisis de trazas en muestras ambientales. El procedimiento desarrollado se comparó con metodologías existentes y se pudo concluir que la extracción en fase sólida del analito utilizando el polímero molecularmente impreso (MISPE) mostró un desempeño superior como fase estacionaria.

Posteriormente se profundizó en el estudio de las propiedades mecánicas de los polímeros impresos y de su selectividad, sintetizándose un polímero selectivo para BeP, utilizando

como soporte inerte partículas de sílica gel (Si-MIP). En este desarrollo logramos disminuir la plasticidad del polímero para no ejercer elevadas presiones durante el pretratamiento de la muestra.

Ambos desarrollos fueron posteriormente adaptados a un sistema en flujo, construido en nuestro laboratorio, lo que nos permitió disminuir los tiempos de análisis y utilizar bajas cantidades de polímero, contribuyendo esto a un análisis sencillo y de pocas etapas. Asímismo, se acopló esta técnica con un sistema de HPLC-DAD para la posterior detección de los PAs.

Por último, como semencionó, debido a su *status* legal, desarrollamos un sensor específico para BuP. Para tal fin se sintetizó un MIS en la superficie de AuNPs electrodepositadas en un electrodo de GC. El desarrollo de este tipo de sensores, nos permitió disminuir el tiempo de análisis así como también el volumen de solventes utilizados sin perder selectividad en el proceso, esto es muy importante a la hora de aplicar la metodología al control de calidad de cosméticos en los cuales, es común encontrar BuP asociado a otros parabenos y excipientes.

En la actualidad se está estudiando el uso de este polímero para la preconcentración del antiparasitario ivermectina y su posterior determinación en agua ambiental. También se está desarrollando un sensor específico para la determinación de triclosan en enjuagues bucales.

En conclusión, los resultados derivados de este trabajo implicaron un aporte en el avance de metodologías que nos permiten determinar selectivamente analitos de interés, pudiendo ser aplicada para la detección de una amplia variedad de compuestos.