



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO DE
IMPRONTA MOLECULAR PARA USO ZOTÉCNICO EN CANES
DETECTORES DE DROGAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

BERENICE ROBLES HEREDIA



**DIRECTOR DE TESIS
DR. JESÚS GRACIA MORA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Jesús Gracia Mora

VOCAL: Profesor: Alma Miriam Novelo Torres

SECRETARIO: Profesor: Jorge Esteban Miranda Calderón

1er. SUPLENTE: Profesor: Carlos Juárez Osornio

2° SUPLENTE: Profesor: Aurora Anais Zurita Cruz

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 100,
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR. FACULTAD DE
QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA: DR. JESÚS GRACIA MORA

SUPERVISOR TÉCNICO: MC. ALONSO SIERRA RESÉNDIZ

SUSTENTANTE: ROBLES HEREDIA BERENICE

Investigación realizada en parte gracias al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM << IT 202317>>**. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida por cinco meses en la modalidad de conclusión de estudios. Proyecto que financió parte de la investigación y donde la Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón es responsable y la Dra. Dinorah Vargas Estrada es corresponsable, por la Facultad M.V.Z, UNAM.

Índice

.....	I
DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR PARA USO ZOOTÉCNICO EN CANES DETECTORES DE DROGAS.	1
Introducción	1
1. Planteamiento de problema	1
2. Hipótesis	2
3. Objetivos	2
3.1 Objetivo general.....	2
3.2 Objetivos particulares	3
4. Antecedentes.	3
4.1 Sustancias de abuso	3
4.2 Olor	5
4.3 Detección del olor.....	5
4.3.1 Detectores biológicos	6
4.3.2 Métodos sensoriales.....	8
4.3.2.1 La olfatometría	8
4.3.2.2 Valor de actividad de olor	8
4.3.3 Métodos instrumentales	9
4.3.3.1 Métodos ópticos.....	9
4.3.3.2 Las narices electrónicas	9
4.3.3.3 Espectrometría de movilidad iónica.....	10
4.3.3.4 La extracción líquido-líquido	10
4.3.3.5 Cromatografía gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS).....	10
4.3.3.6 Cromatografía de Espacio de Cabeza o “HS-CG”	11
4.4 Firmas aromáticas	13
4.4.1 Firmas aromáticas de sustancias de abuso.....	14
4.4.2 Uso de firmas aromáticas en entrenamiento zootécnico.....	18
4.5 Sistemas de liberación de firmas aromáticas en la actualidad	20
4.4.2 Productos comerciales imitadores de drogas y/o explosivos	21
4.5 Polímeros de impronta molecular	24
4.5.1 Síntesis de un polímero de impronta molecular.....	25
4.5.2 Aplicaciones de polímeros de impronta molecular	27
4.5.2.1. Aplicaciones de MIP’s como adsorbentes de moléculas volátiles.	27
5. Metodología	29

5.1 Reactivos	29
5.2 Equipo.....	29
5.3 Método de polimerización	29
5.4 Estudios de adsorción	30
5.5 Estudios de desorción de metil benzoato del MIP _{4-VP}	31
5.5.1 Preparación del lote de metil benzoato adsorbido a MIP _{4-VP}	32
5.5.2 Condiciones a evaluar	32
5.5.2.1 La desorción en un sistema abierto.....	32
5.5.2.2. La desorción durante el almacenamiento	32
5.5.3 Método de extracción de metil benzoato adsorbido a MIP _{4-VP}	32
5.6 Estudios por cromatografía de espacio de cabeza para análisis de ácido acético.	33
5.6.1 Toma de muestra de espacio de cabeza	33
5.7 Espectroscopia Infrarroja (FTIR por ATR)	33
6. Resultados- Discusión	34
6.1 Síntesis del polímero de impronta molecular para adsorción de metil benzoato.....	34
6.1.1 Síntesis del MIP _{4-VP} para adsorción de metil benzoato	35
6.1.2 Espectrofotometría de infrarrojo de 4 vinil piridina y MIP _{4-VP}	37
6.1.3 Estudios de la capacidad de adsorción de metil benzoato a MIP _{4-VP}	38
6.1.4 Extracciones de metil benzoato de MIP _{4-VP}	42
6.1.5 La desorción del metil benzoato adsorbido a MIP _{4-VP} en un sistema abierto	45
6.1.6 Almacenamiento	48
6.2 Síntesis de polímero de impronta molecular para adsorción de ácido acetilsalicílico..	51
6.2.1 Síntesis de MIP _{AA} para adsorción de ácido acetilsalicílico.	52
6.2.2 Infrarrojo de acrilamida y MIP _{AA}	54
6.2.3 Estudios de adsorción de AAS a MIP _{AA}	55
6.2.4 Estudios con cromatografía de gases por técnica de “Head Space” para identificación de ácido acético.....	61
6.2.5 Pruebas en perros realizadas por Facultad de Veterinaria	64
6.2.6 Toxicidad de polímeros acrilamida.....	66
6.3 Acondicionamiento de MIP´s	66
7. Conclusiones	67
7.1 Prospectivas	68
8. Bibliografía	69

Índice de figuras

Figura 1. Representación del equilibrio termodinámico en el espacio de cabeza.	11
Figura 2. Estructuras de heroína y morfina como producto desacetilización.	14
Figura 3. Metil benzoato. Componente principal en el espacio de cabeza de la cocaína. 15	
Figura 4. MDMA y sus componentes principales en su espacio de cabeza.	16
Figura 5. Compuestos encontrados en el espacio de cabeza de la marihuana.	17
Figura 6. Representación general de síntesis de polímeros de impronta molecular no covalentes.	26
Figura 7. Uso del polímero MIP _{4-VP} como imitador de cocaína.	34
Figura 8. Posibles interacciones entre metil benzoato y 4-vinil piridina en la matriz polimérica.	35
Figura 9. Espectros de infrarrojo de 4-vinil piridina y MIP _{4-VP}	38
Figura 10. Curva y espectro de calibración de soluciones de metil benzoato en agua.	39
Figura 11. Perfil de adsorción de MIP _{4-VP} y NIP _{4-VP}	40
Figura 12. Isotherma de adsorción en polímeros MIP _{4-VP}	42
Figura 13. Probable equilibrio e interacción entre metanol y metil benzoato por puentes de hidrógeno.	43
Figura 14. Curva de calibración metil benzoato en MeOH:H ₂ O.	43
Figura 15. Pérdida de metil benzoato por 7 días %(m/m).	46
Figura 16. Pérdida bajo diferentes tipos de almacenamiento por 7 días.	48
Figura 17. Uso del MIP _{AA} como imitador de heroína.	51
Figura 18. Degradación del ácido acetilsalicílico.	52
Figura 19. Posible interacción de enlace de hidrógeno entre el monómero acrilamida y AAS dentro de la matriz polimérica.	53
Figura 20. Espectros de infrarrojo de acrilamida y de polímero MIP _{AA}	55
Figura 21. Curva de calibración de AAS en agua ajustada pH=3.	56
Figura 22. Protonación del ácido acetilsalicílico en medio ácido.	56
Figura 23. Comparación de perfiles de adsorción de MIP _{AA} en diferentes medios.	57
Figura 24. Comparaciones en capacidades de adsorción a diferentes concentraciones en disoluciones de AAS en pH=3.	58
Figura 25. Perfiles de adsorción de AAS de MIP _{AA} y NIP _{AA}	59
Figura 26. Posible interacción de enlaces de hidrógeno del monómero acrilamida con ácido acético dentro de la matriz polimérica.	60
Figura 27. Compuestos en el espacio de cabeza de una muestra de ácido acético.	63
Figura 28. Compuestos encontrados en el espacio de cabeza de una muestra de MIP _{AA}	64
Figura 29. Entrenamiento de búsqueda de heroína con MIPAA.	65

Índice de tablas

Tabla 1. Listado de los compuestos dominantes en el “espacio de cabeza” de algunas sustancias de abuso y explosivos. Traducido de (Macias 2009).	17
Tabla 2. Algunas de las formulaciones listadas de Sigma Pseudo ^{MR}	24

Tabla 3. Metodología de síntesis de MIP's	30
Tabla 4. Metodología de estudios de adsorción de MIP's	31
Tabla 5. Tabla de porcentaje desorbido de metil benzoato, durante 7 días.....	46
Tabla 6. Mg de metil benzoato adsorbido por gramo de MIP _{4-VP} a través del tiempo	47
Tabla 7. Comparación de porcentaje de desorción de MIP _{4-VP} contra gel de sílice.	49

Listado de Abreviaturas

AAS: ácido acetilsalicílico

AcOH: ácido acético

COV: compuestos orgánicos volátiles

FID: detector de ionización de flama.

HS-GC: Técnica de espacio de cabeza -cromatografía de gases

MB: Metil benzoato

MDMA: metanfetaminas o 3-metoxi-4,5-metilendioxfanfetamina

MIP: polímero de impronta molecular

MIP_{AA}: polímero de impronta molecular de acrilamida

MIP_{4-VP}: polímero de impronta molecular de 4-vinil piridina

NIP: polímero sin impronta.

OAV: valor de actividad de olor

SPME: micro extracción en fase sólida.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR PARA USO ZOOTÉCNICO EN CANES DETECTORES DE DROGAS.

Introducción

1. Planteamiento de problema

El análisis químico instrumental representa una importante aportación al estudio e identificación de los principales compuestos volátiles emanados por explosivos, drogas y cadáveres, con ello se contribuyó al desarrollo de herramientas para entrenar canes detectores de drogas ya que se podía condicionar al perro para generar alguna respuesta ante con los olores característicos del compuesto, sin tener a la droga o explosivo presente; no obstante, se detectó la necesidad de sustituir a las sustancias químicas reales, durante el entrenamiento, debido a su elevado costo, riesgos de manejo y almacenaje, además de los problemas ligados a permisos de adquisición. Hoy en día existe una amplia variedad de marcas y formas en las que se presentan estos productos sustitutos llamados imitadores o pseudos.

En el mercado, algunos productos imitadores de sustancias ilícitas se encuentran formados por matrices de gel de sílice, a la que se adsorben las sustancias volátiles características de aquello que sea el objetivo del entrenamiento del perro. Si bien está probada su eficacia, presentan problemas como contaminación ambiental al no ser una matriz selectiva, razón por la cual el entrenamiento debe realizarse en condiciones muy controladas y es complicadas de efectuarse en campo abierto. Otro problema que se presenta es la duración del aroma, ya que la vida útil de algunos productos es de 45 minutos a temperatura ambiente. Se trata de un

producto que debe almacenarse en refrigeración, pues una vez expuesto al aire libre su estabilidad se ve afectada.

En el presente trabajo se espera generar productos de entrenamiento con aromas que brinden calidad, en cuanto al estímulo a lo largo de los entrenamientos, de menor costo, nuevas matrices con mayor capacidad de adsorción y duración del aroma, así como menores tasas de contaminación y una información comercial respaldada por análisis científicos, junto con el desarrollo de productos nacionales que reduzcan los tiempos de entrega y costos por importaciones.

Para lograr lo anterior el uso de un polímero de impronta molecular o también llamado MIP, permitirá la adsorción selectiva de las moléculas volátiles propias de las sustancias de abuso, ya que se formarán cavidades específicas para dichas moléculas minimizando así las potenciales contaminaciones ambientales y ofreciendo una desorción más controlada a través del tiempo resultando en una matriz de con mayor durabilidad en la intensidad del aroma, tanto para almacenamiento como durante entrenamiento.

2. Hipótesis

El polímero de impronta molecular presenta cavidades específicas y afines para las moléculas volátiles propias de las sustancias ilícitas, dicha especificidad evitará las contaminaciones ambientales del producto y ofrecerá una mayor duración del aroma al tener una desorción más lenta.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar y caracterizar un sistema de liberación de olores a partir de polímeros de impronta molecular. Un polímero capaz de adsorber acetilsalicílico y ácido

acético, para imitar la firma aromática de heroína; así como un polímero capaz de adsorber metil benzoato, para imitar cocaína.

3.2 Objetivos particulares

- Sintetizar los de polímeros de impronta molecular específicos de ácido acetilsalicílico y ácido acético, así como de metil benzoato.
- Caracterizar la máxima capacidad de carga de los polímeros a partir de perfiles de adsorción de los polímeros.
- Evaluar el proceso de impronta comparando la capacidad de adsorción de un polímero de impronta contra uno sin impronta.
- Caracterizar los grupos funcionales en el MIP después del proceso de polimerización por técnicas de espectroscopía de infrarrojo.
- Estudiar la desorción en los polímeros a través del tiempo.

4. Antecedentes.

4.1 Sustancias de abuso

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las drogas como cualquier sustancia psicoactiva que en el interior de un organismo viviente puede modificar su percepción, estado de ánimo, cognición, conducta o funciones motoras.

Coloquialmente, se emplea el término droga ilegal o ilícita al hablar de aquellas que están bajo un control internacional, que pueden o no tener un uso médico legítimo, pero que son producidas, traficadas y/o consumidas fuera del marco legal. Las sustancias de abuso más comunes comprenden: marihuana, cocaína, heroína y metanfetaminas

En México, en general, todo acto relacionado con estupefacientes (como heroína y cocaína) y psicotrópicos (como metanfetaminas y cannabinoides) está prohibido en el territorio nacional, según se establece en el título décimo segundo de la Ley General de Salud, a menos que se cuente con un permiso expedido por la Secretaría de Salud en el que se justifique su aplicación.

Dichas leyes y sanciones se han aplicado debido a que estas sustancias presentan un grave problema de salud pública, un fenómeno que tiene consecuencias adversas en la salud individual, en la integración familiar y al desarrollo y la estabilidad social. Esto sumado a la incidencia de adicciones en edades cada vez más jóvenes. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Adicciones 2002 (Comisión Nacional contra las Adicciones 2004), realizada por el Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI), 3.5 millones de personas entre los 12 y 65 años han usado drogas, de acuerdo con la encuesta de ese entonces, lo cual nos muestra la gravedad del problema existente, tanto para las generaciones actuales, como para las futuras.

Parte del decomiso de estas sustancias se encuentra en manos de las Fuerzas Armadas de México y junto con ellos, en la Unidad Canina de la Policía Federal que cuentan con más de mil 900 perros adiestrados en un entrenamiento integral para detección de explosivos, narcóticos, labores de búsqueda y rescate en zonas colapsadas de México (Flores Martínez 2017). Cabe mencionar que las Unidades Caninas de las Dependencias entrenan con Pseudo elaborada en el extranjero.

Ellos llaman "*binomio*" a la combinación de una mujer u hombre policía y su perro, quienes aprovechan el agudo sentido del olfato del can para detectar sustancias de abuso y explosivos traficados de manera ilegal; este trabajo es realizado en revisiones en centrales camioneras, aeropuertos, puertos marítimos, paqueterías, puntos de revisiones carreteros o bien en donde así sean requeridos.

4.2 Olor

Un olor es una mezcla compuestos químicos volatilizados que estimulan las neuronas olfativas. Los productos químicos transportados por el aire inhalado son atrapados y disueltos en el epitelio olfativo, una pequeña región de ambas cavidades nasales donde los odorantes estimulan una respuesta eléctrica de los nervios olfativos: la señal olfativa se transmite así al cerebro, donde el olor final percibido resulta de una serie de procesos neurológicos. (Pearce 1997). En otras palabras, la percepción de un olor se considera un proceso de dos pasos: el paso fisiológico, que comprende la estimulación de los receptores en la nariz por los estímulos (odorantes), y el paso psicológico, donde los olores son procesados por la región del cerebro responsable del olfato. (Macias et al. 2010). El sistema biológico responsable de este proceso de percepción del olor se conoce como sistema olfativo.

Para que un compuesto pueda ser detectado por el olfato de un animal requiere ser volátil a temperatura ambiente. Usualmente se trata de compuestos orgánicos e hidrofóbicos, conteniendo un número limitado de grupos funcionales. Sin embargo, el grupo funcional no es un prerequisite para desprender el olor (Rossiter 1996). En consecuencia, los compuestos son aniónicos con un peso molecular menor a 300.

4.3 Detección del olor

El olor de una sustancia puede ser caracterizada debido a que existen compuestos orgánicos volátiles, que se encuentran de forma dominante en cada muestra (N Lorenzo y Hsu, YL 2002) .

Los enfoques instrumentales para la caracterización de los odorantes se basan en la evaluación de la composición química del olor en el aire. Se tienen en cuenta los métodos tradicionales de muestreo de compuestos orgánicos volátiles (COV) como adsorbentes, bolsas metálicas y bolsas de polímero. Los procedimientos de

muestreo aseguran la integridad de la muestra, preservan el olor originalmente asociado a la muestra, minimizan las pérdidas y la interacción físico-química entre los olores y el medio de muestreo (Hudson y Ayoko 2008).

El límite principal de estas técnicas se basa en la complejidad del olor; el olor percibido es el resultado de muchos productos químicos volátiles, a menudo en concentraciones inferiores al límite de detección instrumental.

Pese al esfuerzo de los científicos por describir los olores de una forma más apegada al método científico y menos subjetiva, existen excepciones donde no existe una correlación lineal entre la sustancia cuantificada y el estímulo oloroso (Francesco et al. 2001). Por esa razón el sistema olfativo de un mamífero es considerado una de los sistemas más complejos y sensibles, a la fecha son considerados excelentes detectores.

4.3.1 Detectores biológicos

Perros

La respuesta detector-perro es una de las principales aplicaciones involucradas en los estudios de detección de olores. La mayor importancia para el sentido del olfato en los perros sobre los otros sentidos se puede atribuir al tamaño de los bulbos olfativos en el cerebro del perro. Los bulbos olfativos de los perros son cuatro veces más grandes que en los humanos y comprenden un porcentaje mayor del cerebro total (Quignon et al. 2003).

El sistema de detección natural en los caninos es el proceso biológico de inhalación de odorantes que son interpretados por un impulso nervioso. Es un sistema dinámico que ocurre en menos de un segundo, el volumen de aire inhalado a través de su nariz es alrededor de $60 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1}$ (Settles 2005), con una frecuencia de 5Hz, esto totaliza 300 mL de aire olfateado cada segundo. Dadas estas condiciones, la respiración combinada con su avanzado sistema olfativo, da canino la capacidad de buscar e identificar olores de manera rápida y eficiente. Es ampliamente reconocido

que los caninos, generalmente, son superiores para la detección de olores debido a la velocidad, versatilidad, robustez y poder de discriminación (Kenneth G Furton et al., 2015).

Ratas

El interés en otros animales, que poseen sistemas olfativos altamente discriminatorios como detectores de olores potenciales, ha llevado a la experimentación con ratas. Los experimentos con la rata marrón común (*Rattus norvegicus*) demostraron que las ratas pueden aprender a exhibir comportamientos de alerta únicos al identificar una variedad de olores (Otto Brown y Long, 2002). Otros estudios con la rata gigante de África (*Cricetomys gambianus*), demostraron que el uso de ratas para evaluar el riesgo de minas terrestres es un método de detección de minas muy prometedor (James Madison University, 1999).

Cerdos (Sus scrofa domestica)

Aunque existe poca documentación sobre el uso de cerdos para la ubicación de minas terrestres, se cree que los cerdos localizan los olores con mayor precisión que los perros y su uso para encontrar trufas es bien conocido (R Claus, H O Hoppen, y H Karg 1981). No obstante, los cerdos están centrados en comer y dormir por lo que no se encuentran motivados por las recompensas sociales dadas por su manejador, estudios muestran que sólo las hembras son elegibles para entrenar ya que los machos suelen tener conductas agresivas (Macias 2009).

Abejas

Las abejas recolectan TNT y otros contaminantes químicos, en el medio ambiente, mientras polinizan las plantas. Llevan estas sustancias de regreso a la colmena y se analiza la presencia de estas sustancias en miel y panales. Las desventajas de este método incluyen el gran gasto en el entrenamiento de las abejas y la vida relativamente corta de las colmenas (Rains, Tomberlin y Kulasiri, 2008).

Plantas

El papel de las plantas como detectores se limita al explosivo TNT. Han sido mutados para contener un gen receptor que los hace fluorescentes en presencia de TNT en el suelo. Pueden ayudar en la remediación de suelos contaminados con municiones químicas. Los límites de detección de este detector aún no se conocen y, dado que sólo funciona en presencia de TNT, no detecta la multitud de explosivos disponibles con fines ilícitos (Almirall et al., 2012).

4.3.2 Métodos sensoriales

4.3.2.1 La olfatometría

La olfatometría es el método estandarizado utilizado para determinar la concentración de olores y evaluar el impacto del olor. Esta metodología se basa en el uso de un instrumento de dilución, llamado olfatómetro, que presenta la muestra de olor diluido con aire libre de olor en proporciones precisas, a un panel de evaluadores humanos. Los examinadores se seleccionan de conformidad con un procedimiento estandarizado realizado con gases de referencia; los evaluadores que cumplen con los criterios predeterminados de repetibilidad y precisión son seleccionados como panelistas. La concentración de olor, generalmente expresada en unidades de olor “*odor units*” (ou / m^3) es numéricamente igual al factor de dilución necesario para alcanzar el umbral de olor, es decir, la concentración mínima percibida por el 50% de la población ((NSAI)The National Standards Authority of Ireland 2003).

4.3.2.2 Valor de actividad de olor

La percepción del olor es multifacética y compleja, mostrando el papel de los compuestos altamente olorosos presentes en concentraciones extremadamente bajas. Patton y Josephson presentaron originalmente el concepto de OAV “*odor activity value*”. Se ofrece una advertencia para equiparar la alta concentración

química con el alto impacto (Brattoli et al. 2011) del olor (Rice y Koziel 2015b). El OAV se define como la siguiente ecuación:

$$OAV = \frac{[concentración]}{ODT}$$

donde ODT “*odor detector threshold*” es el umbral de detección de olores y se define como la concentración de un compuesto detectado por el 50% de la población. Sin embargo, existe una alta variabilidad entre los ODT reportados incluso en estudios por los mismos investigadores, claramente existe una necesidad de estandarizar las metodologías (Rice y Koziel 2015a).

4.3.3 Métodos instrumentales

4.3.3.1 Métodos ópticos

Algunos ejemplos de detectores ópticos son la espectroscopía Raman portátil para detección de drogas, otras diversas formas de espectroscopía Raman para detección de explosivos y fluorescencia óptica; una técnica que emplea radiación UV para descomponer los fragmentos que producen fluorescencia en los explosivos. (Almirall et al. 2012). Las técnicas ópticas generalmente requieren un tamaño de muestra relativamente grande, en comparación con otras técnicas de detección de trazas y largos tiempos de análisis.

4.3.3.2 Las narices electrónicas

Los sensores para la nariz electrónica o “E-nose” pueden dar respuestas ampliamente ajustadas, como los receptores olfativos en la nariz humana, se basan en “una serie de sensores electrónicos-químicos con especificidad parcial para una amplia gama de olores y un sistema de reconocimiento de patrones apropiado (Gardner y Bartlett 1994).

4.3.3.3 Espectrometría de movilidad iónica

La espectrometría de movilidad iónica “IMS”, por sus siglas en inglés, es el instrumento analítico más utilizado para detectar rastros forenses (principalmente drogas y explosivos). IMS se basa en la diferencia del movimiento de los iones bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado. La técnica crea iones utilizando isótopos radiactivos, como el de ^{241}Am o ^{63}Ni , y como resultado puede operar en condiciones ambientales, eliminando la necesidad de un vacío como se encuentra con otras técnicas, como es el caso de la espectrometría de masas (Eiceman, Karpas, y Hill 2016). Se considera un instrumento ligero y de fácil transporte. por otra parte, carece de especificidad.

4.3.3.4 La extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido se trata de una técnica donde se separa un compuesto basado en su solubilidad relativa entre dos líquidos inmiscibles entre sí. Es una técnica altamente sensible y selectiva, acoplada generalmente a cromatografía de líquidos de altas resolución. Es importante como alternativa cuando es necesario determinar sólo los ácidos orgánicos volátiles (Angela et al. 2014).

4.3.3.5 Cromatografía gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS)

Una de las favoritas en cuanto a la cuantificación de sustancias volátiles, se prefiere por los bajos límites de detección, sin embargo, no es un equipo portátil o barato. Y una de las desventajas relacionadas a los métodos por cromatografía de gases es que deben ser altamente específicos para una sola especie química, comparado con una E-nose que puede analizar diversos tipos de analitos a la vez. (Eiceman, Karpas, y Hill 2016)

4.3.3.6 Cromatografía de Espacio de Cabeza o “HS-CG”

Cuando se trata de estudiar compuestos volátiles, como alcoholes o ácidos grasos volátiles (C2-C6), la técnica de análisis adecuada es la llamada Cromatografía de Gases de Espacio de Cabeza o Head Space-Gas Chromatography (HS-GC), la cual combina la técnica “espacio de cabeza” con la técnica de separación “Cromatografía de gases” (Portari, Marchini, y Jordão 2008). El fundamento de esta prueba indica que una muestra sólida o líquida, sellada en un vial que se mantiene a una temperatura constante, conseguirá un equilibrio termodinámico entre la muestra y la fase gaseosa (Brattoli et al. 2011). Para estas técnicas, la fase gaseosa a la que migran los compuestos volátiles desde la fuente o matriz, se le denomina “**espacio de cabeza**” como se indica en la **Figura 1**.

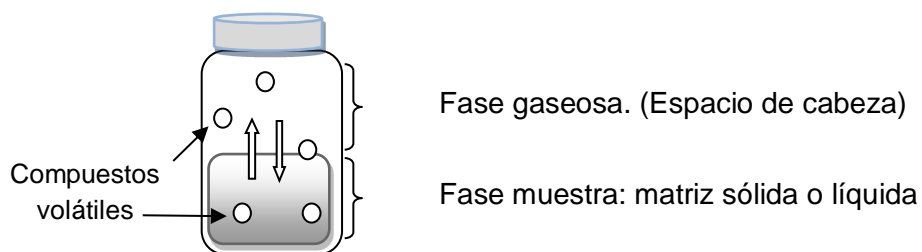


Figura 1. Representación del equilibrio termodinámico en el espacio de cabeza.

En el “espacio de cabeza” se establece un equilibrio termodinámico, que existe cuando se almacena una sustancia en un espacio cerrado, debido a características como pequeño tamaño molecular y baja presión de vapor (Angela et al. 2014).

Los compuestos volátiles que se encuentra en la muestra (fase, fuente o matriz, sólida o líquida), al cabo de un tiempo difundirán hacia la fase gaseosa, en ese momento será posible tomar muestra del analito en el “espacio de cabeza” e ingresarla en estado gaseoso al cromatógrafo, mediante una inyección (Portari, Marchini y Jordão, 2008). Comparando la técnica de “espacio de cabeza” contra la de “inyección directa”, en la primera se evita o minimiza la detección de sustancias no volátiles de poco interés, como cuando se trata de muestras complejas, por ejemplo, muestras clínicas o residuos farmacéuticos. Una de las ventajas de la técnica HS-CG es que se evita la contaminación del inyector y, por tanto, se alarga

la vida de la columna al analizar menos analitos; además, destaca por ser una técnica libre de solventes ya que prácticamente no se producen residuos (Angela et al., 2014).

La separación de componentes en la columna cromatográfica, consiste de procesos de adsorción y desorción; el material que se adsorbe, espontáneamente se desorbe migrando con el fluido gaseoso a causa de un gradiente de presión (EPA 1999).

El paso de una sustancia volátil al “espacio de cabeza” no sólo depende de su volatilidad, en general depende de su afinidad hacia su fase original. Las propiedades termodinámicas del compuesto dictarán como se distribuirá entre las dos fases (matriz y fase gaseosa), la forma más conveniente de calcular esta distribución es a través del coeficiente de partición, simbolizado con la letra K (Tipler 2013).

$$K = \frac{\text{concentración muestra fase original}}{\text{concentración muestra fase gaseosa (espacio de cabeza)}}$$

Con el fin de maximizar la concentración de sustancias volátiles o de minimizar las contaminaciones indeseables, para cuantificar el analito, se debe considerar el valor de K; sustancias con bajo coeficiente de partición tienden a incorporarse a la fase gaseosa más rápidamente. Es posible disminuir el coeficiente de partición cambiando la temperatura o variando la composición de la matriz. La presión de vapor aumenta con la temperatura y, por lo tanto, el valor de K disminuye, provocando que una mayor cantidad del compuesto migre a la fase del “espacio de cabeza”.

Para muestras sólidas, el aumentar su superficie de contacto mediante molienda, aumentará la difusión de los compuestos volátiles que migran de la matriz. Para algunas muestras, la adición de agua provocará una competencia por los sitios activos y se desplazarán ciertos compuestos orgánicos volátiles (COV) de las superficies sólidas, elevando así la concentración de compuestos volátiles en el espacio de cabeza (Restek Corporation 2000).

4.4 Firmas aromáticas

Desde otra perspectiva, el olor que emana de una fuente y a un tiempo dado, se expande en un área indefinida, es dependiente de la concentración, la velocidad del aire y temperatura. El patrón de difusión del olor emitido se denomina “**cono de esencia**”, ya que el movimiento del olor a través del aire esta dado en forma cónica. “El cono de esencia” lo integran el conjunto de compuestos orgánicos volátiles que emanan del compuesto padre (Macias, 2009). Por tanto, los canes entrenados detectan las moléculas en fase gas que emana de la droga o explosivo.

En la búsqueda de una mayor comprensión de las propiedades aromáticas de los compuestos volátiles, se desarrolló el estudio de las “firmas aromáticas”. La “firma aromática” es el conjunto de las sustancias volátiles dominantes en el “espacio de cabeza”, de forma que una determinada sustancia es capaz de provocar respuesta en métodos instrumentales o biológicos.

Las concentraciones de moléculas en el aire de los narcóticos presentan presiones de vapor bajas (Murray 2003). Su identificación requiere de métodos altamente sensibles, como la cromatografía de gases. Recientemente, se han desarrollado técnicas y equipos sofisticados para mejorar el análisis: incluida la criogenia, la micro extracción en fase sólida junto con el muestreo de Head Space automatizado y cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas (SPME-GC / MS) (Portari, Marchini, y Jordão 2008). Esta última técnica, muestra un gran potencial de apoyo a la investigación y comprensión del complicado proceso de detección de olores de los caninos. Sin embargo, el equipo es costoso y requiere personal altamente capacitado (Norma Lorenzo et al., 2003).

Existen probablemente más de sesenta detectores que se han utilizado en CG y la mayoría de ellos se basan en la formación de iones por algún método. Entre ellos, el detector de ionización de llama (FID) se convierte en el más popular. (Miller 2009). El método de análisis de ácidos volátiles con FID provee de una capacidad de detección suficiente.

Sin embargo, debemos señalar que los resultados de las firmas aromáticas de drogas, pueden variar de acuerdo a los diferentes procesos de fabricación, agentes de corte y pureza (Macias 2009), así como, que la cantidad y edad de la droga cause que la concentración de COV cambie (Rice y Koziel 2015a).

4.4.1 Firmas aromáticas de sustancias de abuso

Heroína

La heroína, clasificada como estupefaciente, es considerada una sustancia de abuso, derivada del opio. La heroína es usada para mialgias y como analgésico en caso de enfermedades terminales.¹ Estudios de firma aromática en heroína, analizado mediante HS-GC, muestran al ácido acético como compuesto dominante, esto generado del proceso de desacetilización de heroína que produce morfina. **Figura 2** (Norma Lorenzo et al. 2003). Los estudios indican que el espacio de cabeza de muchas muestras de heroína (frescas, bien almacenadas y / o bien conservadas) posee restos de los diversos solventes utilizados en proceso de fabricación (por ejemplo, acetona, éter dietílico, metil isobutil cetona, metil etil cetona, acetato de etilo) (Chiarotti, Fucci y Furnari, 1991). Los disolventes que se utilizan difieren según la región de origen de la heroína.

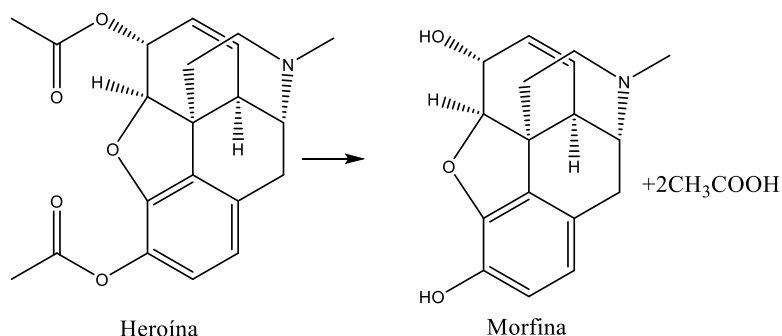


Figura 2. Estructuras de heroína y morfina como producto desacetilización.

¹ drugbank.ca/drugs/DB01452.

Cocaína

La cocaína clasificada como estupefaciente, es un alcaloide de tipo ecgonina. Usado como anestésico local y vasoconstrictor con efectos en sistema nervioso central, altamente adictivo.² Los estudios han demostrado que la exposición del clorhidrato de cocaína, a condiciones ambientales normales, producirá benzoato de metilo como producto de degradación. El benzoato de metilo referido en **Figura 3**, tiene una tasa de disipación de 62 ng/min⁻¹ a 40 ° C, con 80% de humedad relativa. Esto es detectable ya que el benzoato de metilo tiene una presión de vapor muy alta, 0,38 Torr a 25° C (Kuhlman et al. 1997).

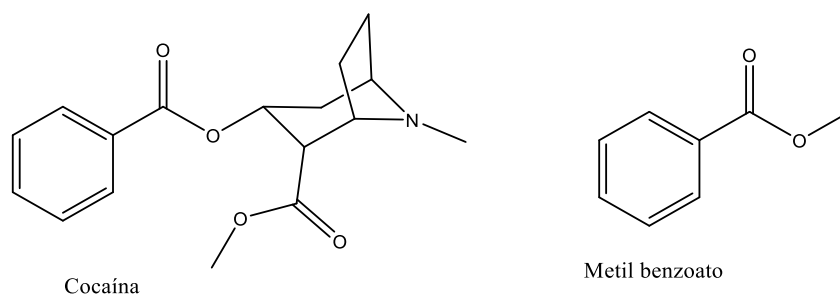


Figura 3. Metil benzoato. Componente principal en el espacio de cabeza de la cocaína.

Metanfetaminas

Las metanfetaminas están clasificadas como psicotrópicos con efecto simpaticomimético y psicoestimulante, usado en el tratamiento de déficit de atención, altamente adictivas.³ En el caso de la familia de las anfetaminas, también conocida como éxtasis, se han encontrado diversas rutas de síntesis, las cuales tienen en común el safrol, isosafrol y piperonal, este último un aldehído. En el caso de MDMA o 3-metoxi-4,5-metilendioxfanfetamina su alta polaridad y baja presión de vapor hacen que la micro extracción en fase sólida (SPME) de las tabletas sea ineficaz. Afortunadamente, la alta presión de vapor del piperonal (1.0 mmHg a 87 °C), permite analizar el espacio de cabeza por muestreo de SPME. A través de ensayos caninos, así como análisis SPME-GC /MS. Los compuestos principales

² drugbank.ca/drugs/DB01452

³ <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01577>.

encontrados en el espacio de cabeza de MDMA se han identificado como piperonal y 3,4-metilendioxi-fenil-2-propanona (MD-P2P) (Norma Lorenzo et al., 2003), señalados en la **Figura 4**.

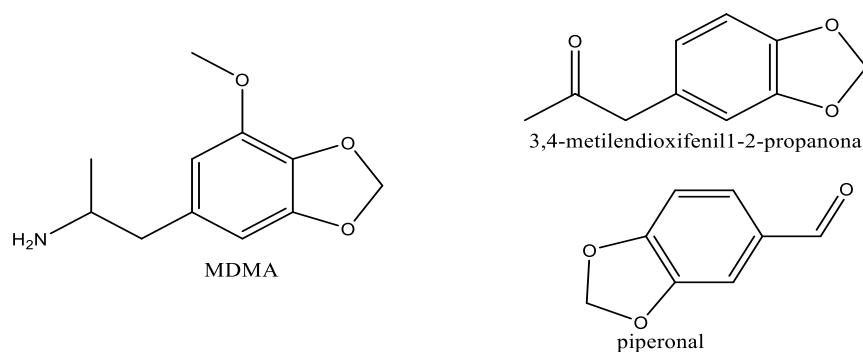


Figura 4. MDMA y sus componentes principales en su espacio de cabeza.

Marihuana

La marihuana es una sustancia de abuso, usada experimentalmente para tratar dolor crónico, espasticidad, inflamación, epilepsia y náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia⁴. Hasta 2008, en el artículo publicado por (Lai, Corbin, y Almirall 2008), se consideraban como compuestos responsables del olor de la marihuana, al limoneno, α / β -pineno, y β -mirceno, expuestos en la **Figura 5**. No obstante, un estudio generó controversia al utilizar el análisis químico y sensorial simultáneo, para analizar los volátiles del espacio de cabeza de la marihuana, si bien comprobó la presencia de los compuestos antes mencionados no indicó que produjeran una respuesta sensorial (Rice y Koziel 2015b). En dicho trabajo, se detectó más de 240 compuestos emanados por marihuana y se publicó que sólo el 9% de los compuestos químicos, detectados por espectrometría de masas en el espacio de cabeza de marihuana, tenían un aroma asociado; el 75% de los compuestos no tenía un aroma asociado y el 16% de los compuestos registrados tenían una señal de detección baja pero un aroma detectado. Los autores generaron una lista de los compuestos claves responsables del olor de marihuana basada en su relación

⁴ <https://www.drugbank.ca/drugs/DB14009>

concentración química/respuesta sensorial o bien OAV siendo la siguiente: 1) Benzaldehído, 2) Mirceno, 3) Decanal, 4) Heptanal, 5) Antranilato de metilo, 6) Octanal, 7) Hexanal, 8) Metiliso-hex-enil cetona, 9) Linalool, 10) β -Cariofileno, 11) α -Humeleno y 12) Ácido acético. Concluyeron que los volátiles mejor clasificados no están de acuerdo con lo que actualmente se conoce como compuestos olorosos clave, responsables del olor a marihuana.

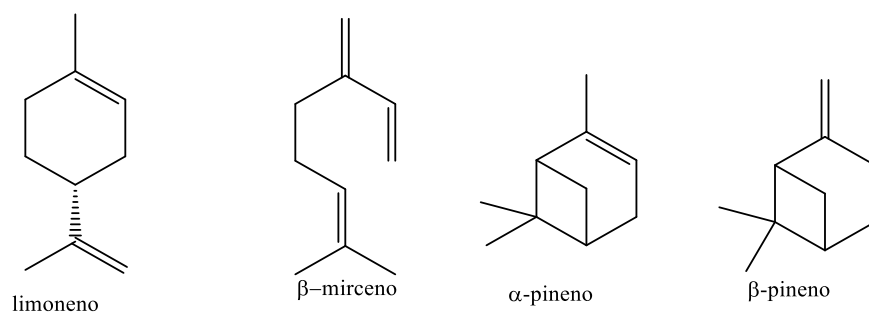


Figura 5. Compuestos encontrados en el espacio de cabeza de la marihuana.

Tabla 1. Listado de los compuestos dominantes en el “espacio de cabeza” de algunas sustancias de abuso y explosivos. Traducido de (Macias 2009).

Especie forense	Objeto blanco	Olor primario	Olor secundario
Sustancias de abuso.	Cocaína	Metil benzoato	Ácido benzoico
	Heroína	Ácido acético	NA
	Metanfetamina	Benzaldehído	
	MDMA	Piperonal	Ácido benzoico
	Marihuana	β -pipeno cariofileno	Limoneno Mirceno
Explosivos	TNT-explosivos	2-4 dinitrotolueno	
	PBX. (explosivo en polvo aglutinado)	2-etil-1 hexanol	Polvo sin humo

4.4.2 Uso de firmas aromáticas en entrenamiento zootécnico

Olores emanados por narcóticos, explosivos o incluso cadáveres son percibidos por “detectores biológicos” (perros, ratas o cerdos), a menores concentraciones de las que los humanos somos capaces de detectar. Los umbrales de detección de olores, para los caninos, son hasta 10 órdenes de magnitud más bajos que de los humanos, en el caso de odorantes comunes como los ácidos grasos volátiles (Neuhaus, 1953). Por ejemplo, se determinó que los caninos entrenados requieren al menos 10 ng/s de benzoato de metilo, compuesto orgánico volátil que alerta sobre la presencia de cocaína (K. G. Furton et al. 2002); en otra investigación, los límites de detección de nitroglicerina (NG) y benzoato de metilo por caninos entrenados, se ubicaron en el rango de 10 ppb (parte por billón).

Los caninos poseen excelentes límites de detección que dependen del compuesto objetivo y se refieren valores de 500 ppt (parte por trillón) para 2,4-DNT y 2,3-dimetil-2,3-dinitrobenceno (DMNB) (Johnston 1999).

N Lorenzo y Hsu, YL (2002), publicaron el éxito para la detección de piperonal, por caninos entrenados en búsqueda de éxtasis. El hecho se explica por la presencia dominante de piperonal en el espacio de cabeza de fármacos que contienen 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), como para la droga éxtasis. Al año siguiente, Norma Lorenzo et al. (2003) demostró que los caninos muestran una respuesta sobre la presencia de piperonal a una concentración de 10-100 mg, en tabletas de MDMA.

Por su parte, utilizando SPME-GC-MS, K. G. Furton et al., (2002) mostró que el compuesto químico benzoato de metilo tiene presencia dominante en el espacio de cabeza de muestras de cocaína (base y variedades de sal). El benzoato de metilo se introdujo en pruebas de campo para evaluar el reconocimiento del benzoato de metilo con caninos entrenados. Se concluyó que el benzoato de metilo es un imitador de ayuda, preciso y confiable, para el entrenamiento para la cocaína. el

compuesto es capaz de alertar a los detectores biológicos (Macias 2009). Los resultados sugieren y que la dosis efectiva para el 50% de los animales analizados es de aproximadamente 1 µg de benzoato de metilo. Se conoce que existen impurezas en las muestras de cocaína, por ejemplo: en ácido benzoico, anhidroecgoninmetil éster, anhidroecgonina, ácido trans-cinámico, ecgoninemetil éster, ecgonina, pseudoecgonina (Casale 1991). El estudio realizado por Furton los perros no mostraron respuesta para 1 mg de ácido benzoico ni para 1 mg ácido trans-cinámico. Uno de los perros del estudio mostró respuesta a la mezcla de ácido benzoico y metil benzoato.

Se ha informado que los VOC en el espacio de cabeza de marihuana consisten de: limoneno, α-pineno, β-pineno, β-mirceno, β-ocimeno, β-cariofileno, α-cariofileno, entre otros compuestos (Rice y Koziel 2015c).

Macias (2009) dijo que una mezcla de α-pineno, β-pineno, mirceno, limoneno y β-cariofileno, asociados con marihuana, mostró respuestas de alerta baja cuando se probó en el campo con perros de detección de narcóticos. En un estudio posterior, Rice y Koziel (2015b) sugieren que se debe centrar más la atención en los compuestos con alto olor, típicamente presentes en bajas concentraciones, como nonanal, decanol, o-cimeno, benzaldehído, que tienen un impacto de olor más potente que los volátiles del espacio de cabeza de marihuana, comentados anteriormente.

Dado que el ácido acético es el compuesto dominante en el espacio de cabeza de la heroína, Macias (2009) realizó un estudio donde evaluó la respuesta de los canes a diferentes diluciones con vinagre (concentración de ácido acético entre 4-18%). Durante las pruebas de campo ningún perro mostró respuesta hacia las diluciones, así que generó dos teorías: la cantidad de ácido acético no estaba en el rango adecuado para imitar heroína o bien el perfil de olor de la heroína, tal como lo reconocen los caninos detectores, es más complejo que el compuesto solitario ácido acético. A la par, realizó otro experimento donde 6 de 14 caninos vincularon respuestas sobre una mezcla de 50% de ácido acético y 50 % de ácido salicílico.

Dentro del estudio de Macias, el ácido salicílico fue el segundo compuesto más abundante detectado dentro del espacio de cabeza de un imitador de heroína, analizado por SPME-CG; sin embargo, el ácido salicílico no se detectó en muestras de heroína y no se ha informado en estudios anteriores.

4.5 Sistemas de liberación de firmas aromáticas en la actualidad

Dada la información generada por el estudio de firmas aromáticas, se diversificaron productos que imitaran drogas, explosivos, cadáveres, entre otros. Una "imitación de olor" es una imitación o simulación que incorpora los compuestos dominantes que se encuentran en el espacio de cabeza del compuesto real y puede usarse en su lugar. Se consideran una ayuda de entrenamiento y / o un estándar de calibración para detectores biológicos e instrumentales (Macias et al. 2010).

Algunas prácticas consisten en impregnar dichos compuestos en gasas o adsorberla en otros materiales. El método óptimo de presentación de estos productos depende de la forma física de los compuestos químicos que comprenden el imitador del olor, es decir, forma sólida grande, en polvo o líquida.

La adsorción es un proceso exotérmico y el método más tradicional para adsorción de carbonos orgánicos volátiles. El carbón activado, el tamiz molecular y el gel de sílice son materiales porosos con una área de gran superficie para la adsorción física y química. La adsorción física implica que los COV quedan atrapados en materiales adsorbentes sin cambiar su forma original y pueden ser desorbidos fácilmente por calor o vacío (Environmental Protection Agency 1999).

Los materiales para contenedores de olor y las líneas de muestreo deben ser inodoros, sufrir reacciones físicas o químicas mínimas con la muestra de aire y tener una baja permeabilidad, para minimizar las pérdidas de muestra por difusión y / o adsorción. Los contenedores más utilizados incluyen latas de pintura, cajas de

fragancias, jaulas de fragancias, tuberías de PVC, tubos de permeación y polímeros (Macias 2009).

Un ejemplo de los sistemas poliméricos existentes es el sistema de permeación mimética de olor controlado o también llamados (COMPS) por sus siglas en inglés. Los COMPS consisten en una bolsa polimérica permeable de polietileno de baja densidad. En un estudio realizado por Macias et al. (2010), quien buscaba calibrar con ayuda de COMPS los límites de detección de caninos, se incorporó diferentes gramajes de piperonal al 99% en bolsas poliméricas, los resultaron arrojaron que el 60% (3/5) de los perros mostraron una respuesta por los dispositivos COMPS que contenían 80 mg y 120 mg de piperonal. Los COMPS ofrecen la presentación del imitador del olor con una liberación controlada que permite un suministro medible y reproducible del olor, no obstante, a la par el mismo experimento se realizó en otro laboratorio y no coincidieron los resultados, atribuyendo a que se habían obtenido las bolsas de polietileno de baja densidad de otras fuentes.

Estudios indican que un perro entrenado con estos imitadores o pseudos, también responderían de la misma forma a las sustancias ilícitas reales. Sin embargo, existen autores que ponen en duda la efectividad de estos imitadores. Rice y Koziel (2015a), menciona que las sustancias más abundantes encontradas en una firma aromática pueden engañar al investigador cuando se trata de encontrar el olor completo de alguna sustancia. Las formulaciones de aroma sustituto/pseudo deben coincidir con el impacto del olor de los compuestos clave y no sólo con la abundancia química de los compuestos, supone que algunas formulaciones con aroma sustituto no funcionan ya que sobrecargan la matriz con algún olor/aroma abundante el cual resta de importancia.

4.4.2 Productos comerciales imitadores de drogas y/o explosivos

Hasta la conclusión del presente trabajo no se encontraron referencias científicas que validen las promesas publicitarias de los productos imitadores como: duración del producto, baja tasa de contaminación y consistencia de la firma aromática,

durante el tiempo que indican la vida útil del producto. Los consumidores critican la corta duración de algunos de estos productos una vez expuestos al trabajo de campo ya que la desorción no se realiza de manera controlada a través del tiempo, situación que aumenta la variabilidad de molécula emanada del producto, por lo que no existe un estándar o calibración. Se ha planteado la hipótesis de que los caninos que entrenan en niveles variables de olor, generalmente reconocerán y alertarán sobre un rango más amplio de olor que los caninos que sólo entrenan en una sola cantidad de olor (Macias et al. 2010), por lo que una ventaja del entrenamiento con polvos parte de la posibilidad de variar las cantidades a utilizar.

El acceso a información como composición y desarrollo de estos productos está limitada. A continuación, se presentan algunas marcas e información proporcionada por los sitios web, de manera muy general, sobre su composición, tipo de almacenamiento e indicaciones de uso:

- ❖ Scent logicX^{MR}, imitador en polvo, que no especifica su material adsorbente, se encuentra colocado en una bolsa aluminizada e indica almacenamiento en refrigeración.
- ❖ Sokks^{MR}, comprende un sistema de entrenamiento en el que se introducen micropartículas específicas, de varios materiales activos reales, en un sólo producto, afirma ser de alta pureza y, con un adecuado almacenamiento, asegura baja tasa de contaminación debido al cierre que posee su envase, no al sistema por sí mismo. Señala que el producto puede usarse cerca de 10 veces, no obstante, no hace referencia a los intervalos de tiempo de uso, así que se vuelve una cifra ambigua. Requiere almacenarse en un lugar frío y oscuro, indica que no debe exponerse a luz brillante y altas temperaturas durante largos períodos de tiempo.
- ❖ Truescent k9^{MR}, es una marca que incorpora explosivos, en un diluyente inodoro, colocados en una bolsa que permita dispersar la firma del aroma durante el entrenamiento, señala que cuando se manipulan y almacenan adecuadamente (refrigeración) son estables cerca de un año, se menciona una degradación en

7 días a altas temperaturas (temperatura no indicada), refiere una degradación completa en 21 días a temperatura ambiente y en refrigeración reporta que un 50% de degradación, en 90 días. Por otra parte, no indica la relación que existe entre la cantidad degradada y la permanencia de una esencia confiable para el entrenamiento.

- ❖ NESTT ^{MR}, es un producto desarrollado por la universidad de Lawrence Livemore, California. Sus dos presentaciones están disponibles en una lata metálica, una matriz de sílice recubierta y una base de vaselina. La sílice recubierta se fabrica recubriendo sílice con compuestos nitrogenados (nitroaminas, ésteres de nitratos y nitratos de potasio) y cloratos de potasio. La base de vaselina NESTT se prepara dispersando los mismos agentes en una base de cera ligera. Sus productos están avalados por investigación donde se determinaron los límites de detección de nitro metano en pruebas con perros y confirmadas por estudios de Head Space.
- ❖ *Sigma pseudo* ^{MR}, productos de sílice y celulosa microcristalina, que adsorben las moléculas referidas a las firmas aromáticas; se reporta que sus productos liberan una cantidad de esencia confiable para entrenamiento, en un periodo de 30-45 minutos. Existen artículos científicos en la literatura en los que se estudian los componentes volátiles de sus formulaciones, analizados por técnicas como inyección directa, SPME, purga y trampa, y desorción térmica seguida de cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC / MS).

En el trabajo publicado por Rice y Koziel (2015a), donde se compara drogas reales con imitadores de ayuda, se utiliza las formulaciones de Sigma Pseudo como margen de comparación (**Tabla 2**); el artículo evidencia pocas similitudes entre ellos y las drogas reales. No obstante, encuentra la formulación de heroína como la más acertada y sugiere que para empatarla con heroína real debería añadirse COV's, en orden decreciente: isobutiraldehído, ácido acético y acético anhídrido

Tabla 2. Algunas de las formulaciones listadas de Sigma Pseudo^{MR}

<i>Sustancia ilícita a imitar Sigma Pseudo^{MR}</i>	<i>% De inclusión de COV's</i>	<i>%Adsorbente (sílice coloidal pirogénica)</i>	<i>%Diluyente (celulosa microcristalina)</i>
Cocaína	<i>Metil benzoato. (0.1%)</i>	1	98.9
	<i>Ácido Benzoico</i>		
Heroína	<i>Ácido Acético (0.3%)</i>	0.3	74.1
	<i>O-Ácido acetilsalicílico (25.2%)</i>		
3,4- Metildioximetanfetamina	<i>Piperonal</i>	No determinado	No determinado
	<i>Piperonil Metil Cetona</i>		
Marihuana	<i>Butano 2,3 diol (0.4%)</i>	1	98.5
	<i>p-menta-1,4-dieno (0,1%).</i>		

4.5 Polímeros de impronta molecular

Es conocida la unión específica y la afinidad que existe entre los antígenos y los anticuerpos, por lo que la ciencia se ha dado a la tarea de crear entidades sintéticas que imiten la acción de enzimas y anticuerpos. Una atractiva aproximación sintética es la “**impronta molecular**”, que se refiere al concepto de preparación de sitios de reconocimiento selectivo hacia un sustrato, en una matriz polimérica utilizando una molécula como horma o molde.

Los polímeros de impronta molecular o abreviados MIP's, son polímeros altamente reticulados que muestran reconocimiento molecular selectivo para una especie química en particular; tienen cavidades complementarias en geometría e interacciones atractivas, esto les confiere selectividad: moléculas más grandes no cabrán en las cavidades y más pequeñas no tendrán interacciones bien orientadas, por lo que una molécula complementaria maximizará las interacciones favorables.

Estas cavidades de reconocimiento pueden ser formadas a través de un proceso de impronta, la más usual es la no covalente donde la molécula de impronta interactúa como una porción complementaria de uno o varios monómeros funcionales a través de las interacciones no covalentes, generalmente dipolos, electrostática, o enlace de hidrógeno, etc. (García, Cabrita y Costa Freitas, 2011); dicha molécula interactúa con monómeros funcionales para dar un ensamble de preorganización. Posteriormente, se agrega un entrecruzador y un iniciador de polimerización, lo más común es por radicales libres. El poro es formado al retirar la molécula plantilla a través de lavados.

Los MIP presentan una unión preferencial reversible, la unión incluye tanto afinidad como especificidad del polímero impreso por su molécula plantilla (Murray, 2003). Los MIP's en contraste con los anticuerpos naturales, muestran muchas ventajas, tales como alta estabilidad química, excelente reutilización, síntesis relativamente sencilla, reproducible y de bajo costo (Guć y Schroeder, 2017).

4.5.1 Síntesis de un polímero de impronta molecular

La mezcla de reacción de polimerización para la preparación de la MIP está constituida por un monómero funcional polimerizable, la molécula de impronta, agentes de entrecruzamiento para proporcionar una estructura suficientemente rígida, solvente inerte y un iniciador de radicales libres u otro apropiado.

Dado que la interacción entre la molécula horma y el monómero es crucial para el proceso de reconocimiento, debe elegirse el monómero adecuado para el proceso de impronta en la síntesis. Los monómeros generalmente se dividen en: ácidos, básicos y neutros. El monómero ácido más popular es el ácido metacrílico (MAA), mientras que entre los básicos es el más popular es 2- o 4-vinilpiridina (2-VP o 4-VP)(Guć y Schroeder 2017), esto se debe a que la rapidez de copolimerización con los entrecruzadores más comunes, son similares, dando de esta manera copolímeros alternados preferencialmente, en vez de en bloque.

Si bien se prefiere la polimerización por radicales libres, también se pueden seleccionar monómeros que se polimerizan catiónicamente o aniónicamente. Deben seleccionarse condiciones de polimerización que no afecten negativamente a la molécula horma. Cualquier iniciador de radicales libres UV o térmico conocido puede usarse para iniciar este método. Los ejemplos de iniciadores térmicos y UV incluyen: peróxido de benzoilo, peróxido de acetilo, peróxido de laurilo, azobisisobutironitrilo (AIBN) etc.(Murray 2003).

El esquema más común de síntesis de polímeros de impronta molecular se ilustra en la **Figura 6**, donde se parte de una horma o plantilla, se genera un pre-ensamble con moléculas capaces de interactuar con la horma y que también contienen dobles ligaduras, que son las que posteriormente copolimerizan con el entrecruzador, que está en la mayor proporción y le dará cuerpo al polímero. Se remueve la horma y los oligómeros y disolvente de reacción, dejando el polímero con huecos específicos a la horma con la que se sintetizó.

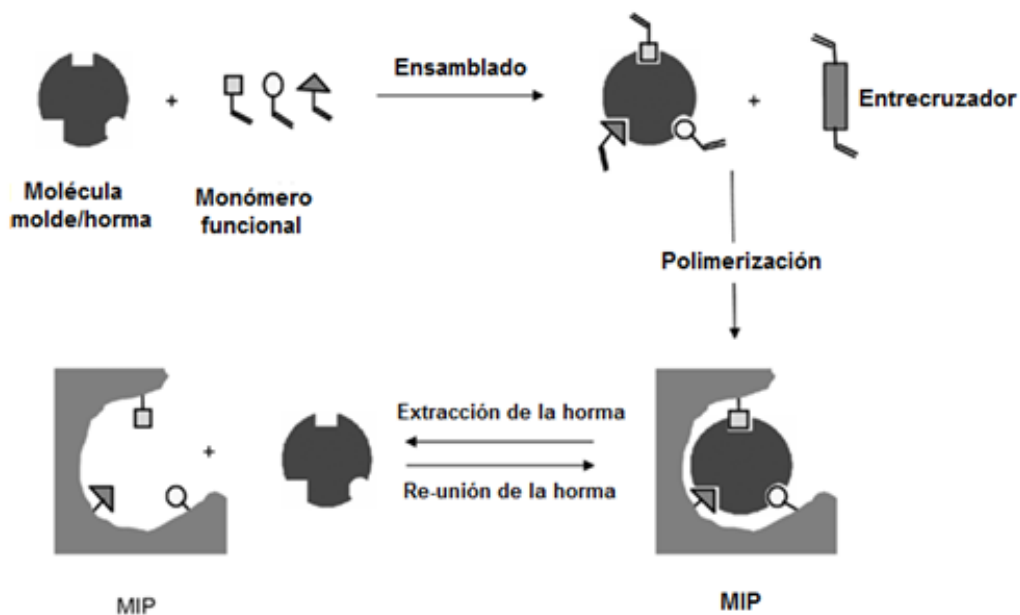


Figura 6. Representación general de síntesis de polímeros de impronta molecular no covalentes.

El papel del solvente, en el proceso de impronta, está relacionado con la formación del poro incluyendo que debe ser capaz de solubilizar a todas las entidades (monómero, plantilla, iniciador y entrecruzador) en la misma fase. Los solventes más comunes utilizados para la síntesis de MIP son tolueno, cloroformo, diclorometano y acetonitrilo (García, Cabrita, y Costa Freitas 2011).

Se puede usar cualquier relación entre el monómero funcional y el entrecruzador. Los expertos en la técnica pueden seleccionar proporciones adecuadas de monómeros para proporcionar la integridad estructural deseada, una proporción muy usual es la proporción molar 1:4:20 de horma, monómero funcional y entrecruzador respectivamente (Murray 2003).

El parámetro principal que describe la eficacia del proceso de impronta se llama factor de impresión. En términos simples, el factor de impresión se define como una relación de la capacidad de unión de la plantilla en el polímero impreso a la capacidad de unión de la plantilla en el polímero de referencia sin impronta. Por lo tanto, la síntesis del polímero sin impronta tiene que llevarse a cabo en las mismas condiciones omitiendo la adición de la molécula horma (Luliński 2017).

4.5.2 Aplicaciones de polímeros de impronta molecular

Los polímeros de impronta molecular han demostrado ser un método poderoso de separación de especies y catálisis. (Karsten y Mosbach 2000). La mayor parte de los sistemas estudiados a la fecha de polímeros de impronta molecular son no covalentes y han sido propuestos como una novedosa herramienta para nuevas metodologías analíticas.

4.5.2.1. Aplicaciones de MIP's como adsorbentes de moléculas volátiles.

Se ha encontrado que los MIP, también adsorben sustancias en fase gas, en forma tan efectiva como en la fase de disolución de hecho, los MIP's han jugado un papel importante de detección en fase vapor y fase gas para control de calidad del aire;

en la detección de explosivos y agentes de guerra, además de otras importantes aplicaciones (Liang, Chen, y Qin 2015).

Una aplicación de MIP como material adsorbente de compuestos volátiles, es el desarrollo de un filtro para mejorar la discriminación de olores, que constó de la combinación de un adsorbente (polidimetilsiloxano) junto con una capa MIP, dispositivo llamado MIFA. En este trabajo se generaron polímeros de impronta de dos tipos; compuestos de ácido poliacrílico (PAA) y ácido metacrílico (MAA) resultando en un filtro con alta especificidad hacia las moléculas molde que fueron tanto alcoholes como ácidos grasos (Shinohara et al., 2016).

Murray (2003) y colaboradores, patentaron un dispositivo que detecta cocaína en fluidos (sangre u orina) ya que funciona uniendo selectivamente los vapores de metil benzoato, un producto de degradación de la cocaína, a un polímero luminiscente de impronta molecular. El polímero posee al ion lantánido Eu^{3+} , luminiscente al UV, como en un complejo de coordinación tiene impronta con metil benzoato. Para la polimerización se utilizó una mezcla de ligandos sustituidos con vinilo, copolímeros de estireno, así como divinil benceno como entrecruzador.

Para la identificación de terpenos en fase gas, se fabricó un sensor de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) cubierto por un polímero de impronta molecular (MIP) para terpeno. El sensor MIP-QCM fue diseñado para mejorar la selectividad del sensor, la membrana MIP contenía el ácido metacrílico, que formaba cavidades específicas originadas por la molécula objetivo (Kikuchi, Tsuru y Shiratori, 2006). Este diseño puede ser útil para detección de marihuana dado el contenido en terpenos en el espacio de cabeza de la sustancia de abuso.

El uso del MIP como adsorbente de volátiles se ha desarrollado e implementado continuamente, no obstante, a la fecha no se ha reportado el uso de polímeros de impronta molecular como sistemas de liberación de olores, ni se han enfocado estudios sobre sus perfiles de desorción en medios no acuosos.

5. Metodología

5.1 Reactivos

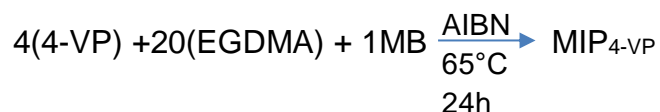
Ácido acetilsalicílico (AAS) al 99%, 4-vinilpiridina (4-VP) al 97%, dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) al 98%, Gel de sílice (Sigma Aldrich); acrilamida (AA) al 98% (Fluka analytical), azobisisobutironitrilo (AIBN) al 98% (Akzonovel), Metil benzoato (MB) al 99% (Alfa Aesar). Acetonitrilo (ACN), ácido acético (AcOH), acetona, etanol (EtOH) (J.T Baker R.A), ácido fosfórico y Metanol (MeOH) grado QP. Los reactivos y disolventes se emplearon sin purificación previa a su uso.

5.2 Equipo

Multiagitador IKA modelo RO5PS1, centrifuga Gilson GMCLab modelo F, Moledora Cole Palmer. Espectrofotómetro UV /visible Ocean optics DT-mini 2GS. Termo agitador Biobase modelo BJPX-1008.

5.3 Método de polimerización

El método de polimerización aplicado fue por radicales libres, utilizando la estequiometría 4:20:1 entre monómero, entrecruzador y horma, respectivamente, para fabricar el llamado MIP_{4-VP}, para la adsorción de metil benzoato; y la estequiometría 3:15:0.5 para fabricar el MIP_{AA}, destinado para la adsorción de ácido acetilsalicílico. La síntesis se llevó a cabo mediante la siguiente reacción y se detalla en la **Tabla 3**.



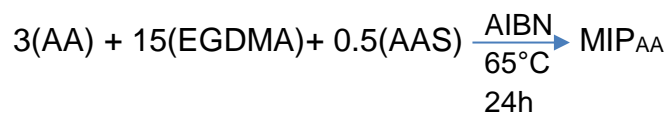


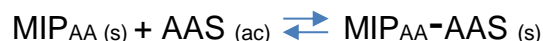
Tabla 3. Metodología de síntesis de MIP´s

Síntesis	Polímero de 4-vinilpiridina (MIP 4-VP)	Polímero de acrilamida (MIP AA)
Polimerización	Disolución de monómero, entrecruzador, plantilla e iniciador de la polimerización (tubo de ensayo de 10 mL con tapón de rosca). Proceso de sonicación por 10 min. Luego, desoxigenación con nitrógeno durante 5 min. Posteriormente, se colocó en la incubadora y la polimerización se realizó a 65°C, durante 24 h	
Molienda y tamizaje	Rotura del tubo, el monolito resultante se trituró en molino. Lavado del polímero con 20 mL de EtOH y acetona, para eliminar los últimos residuos sin reaccionar. Tamizado del polvo fino resultante con malla de 250 micras. Colocación de las partículas tamizadas en saco de extracción de celulosa.	
Lavado	Remoción de la horma por sucesión de lavados con etanol a T.A., durante 3 horas. Monitoreo de metil benzoato (MB) eliminado mediante un espectrómetro UV.	Remoción de la horma en Soxhlet con una mezcla de MeOH / AcOH (7: 3, v / v), a 105 °C, durante 48 h. Monitoreo de AAS eliminado mediante un espectrómetro UV.

Nota: Como referencia, se preparó un polímero no improntado (NIP) de la misma manera que la descrita para el MIP.

5.4 Estudios de adsorción

Los estudios de adsorción se realizaron para determinar la cantidad de molécula molde adsorbida por los MIP al llegar al equilibrio en sistemas acuosos. De la misma forma, se utilizó para evaluar el efecto de impronta comparando su capacidad de adsorción contra un polímero sin impronta. Los equilibrios referidos se muestran a continuación:



Los estudios se realizaron por triplicado en un multiagitador magnético, con control de temperatura a 25°C. Se colocaron 20 mg de una muestra de MIP o NIP, en un vaso con 9 mL de una solución estándar, de concentración conocida de AAS, para el polímero MIP_{AA}, y de metil benzoato para el polímero MIP_{4-VP}. Se monitoreó, por espectroscopía UV-visible los cambios registrados en la absorbancia a través del tiempo, hasta que no hubo un cambio en su valor. El experimento se siguió de acuerdo con las condiciones indicada en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Metodología de estudios de adsorción de MIP's

Condiciones	MIP AA	MIP 4-VP
Concentraciones usadas curva de calibración	[AAS] entre 50-160 mg/L en agua destilada, ajustada a pH 3 con ácido fosfórico	[MB] entre 0.018-0.075 µL/mL en agua destilada
Solución estándar	1000 mg AAS /L de agua destilada ajustada a pH 3	0.6 µL de MB /mL de agua destilada
Tiempo total de muestreo	7 horas	3 horas
Preparación de la muestra	Alicuota de 2 mL en cada tiempo de muestreo. Centrifugación a 6,000 RPM, durante 3 minutos. Filtrar sobrenadante en filtro de pirinola de 0.22 µm.	
Dilución requerida para lectura	200 µL/2000 µL	500 µL/2000 µL
Longitud de onda máxima de absorción	274.66 nm	273.75 nm

5.5 Estudios de desorción de metil benzoato del MIP_{4-VP}

Para evaluar la liberación del metil benzoato, se efectuaron estudios de desorción desde la matriz polimérica a través del tiempo, como se muestra a continuación,



Para ello se consideró a la cantidad liberada o desorbida como la diferencia existente entre la cantidad inicial adsorbida y la cantidad adsorbida a un tiempo "n",

5.5.1 Preparación del lote de metil benzoato adsorbido a MIP_{4-VP}

Sobre el MIP_{4-VP} se vertió una cantidad de 70% de MB, con respecto al peso de polímero disuelto en 3 partes de etanol, y se dejó evaporar etanol por 24 horas, hasta sequedad.

5.5.2 Condiciones a evaluar

5.5.2.1 La desorción en un sistema abierto.

En un vial de vidrio abierto, se colocó MIP_{4-VP} y se mantuvo a temperatura ambiente por siete días, donde sólo el primer día se monitoreó de las 0.00 a 9.00 horas y el resto cada 24 hrs. hasta completar una semana. El muestreo se hizo tomando 40 mg de MIP por triplicado.

5.5.2.2. La desorción durante el almacenamiento

Se colocó la misma cantidad de MIP_{4-VP} en tres viales de vidrio iguales, bajo las siguientes condiciones: vial cerrado en refrigeración, envase cerrado a temperatura ambiente y envase abierto a temperatura ambiente. Pasada una semana se tomó muestra de 40 mg de MIP por triplicado.

5.5.3 Método de extracción de metil benzoato adsorbido a MIP_{4-VP}

La desorción se determinó mediante extracciones múltiples. Cada muestra de 40 mg de MIP_{4-VP}, se colocó un saco de celulosa, este se introdujo en un vaso de 50 mL donde se adicionaron 20 mL de una solución (1:1) metanol: agua, posteriormente, se sellaron los vasos con parafilm y se agitó en un agitador orbital a 100 rpm, a temperatura ambiente. En un tiempo total de seis horas; cada dos horas se reemplazó completamente el medio y se tomó una muestra de 2 mL. La lectura de la muestra se efectuó en un espectro UV/Vis. Los resultados se interpolaron en una curva de calibración.

Nota: se realizó el mismo experimento bajo las mismas condiciones con sílice gel 60, como un adsorbente de referencia.

5.6 Estudios por cromatografía de espacio de cabeza para análisis de ácido acético.

Estos estudios se realizaron en un Cromatógrafo de gases Agilent Technologies, serie 7890A, equipado con un detector de ionización de flama (FID) y con una columna capilar Stabilwax-DA (l: 30 m, DI: 0.25mm, Df: 25 μ m). Las condiciones cromatograficas fueron las siguientes: temperatura de inyector a 250°C, temperatura de horno a 145°C, temperatura de detector a 250°C; Gas acarreador: nitrogeno, presión constate, velocidad linear de 40 cm/sec. Inyección manual, cuyo volumen de Inyección fue de 500 μ L de muestra en fase gas. La inyección fue en modo split con un radio de 1:50. Tiempo de la corrida de 5 minutos.

5.6.1 Toma de muestra de espacio de cabeza

Se pesa 1 g de muestra de MIP_{AA} y se coloca en un vial de 10 mL, seguido se tapa con un septum de PTFE, con una pinza engargoladora se coloca un arillo metálico en el vial. Posteriormente, se sumerge en un baño de aceite a 85°C durante 10 minutos, la temperatura se guio por un termopar. Transcurrido el tiempo se inserta la jeringa cromatográfica Hamilton (modelo 750N) a través del septum, para tomar un volumen de 500 μ L de gas del espacio de cabeza e inmediatamente se inyecta al cromatógrafo. La jeringa se mantuvo a la misma temperatura que el baño para prevenir la condensación en la pared.

5.7 Espectroscopia Infrarroja (FTIR por ATR)

La Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier y Reflectancia Total Atenuada, se llevó a cabo por reflectancia ATR, en un espectrofotómetro de FTIR, modelo 4000, de Perkin-Elmer. La toma de datos se realizó en una escala de 4000 cm^{-1} hasta 400 cm^{-1} . Las muestras sólidas fueron colocadas en la celda de ATR sin preparación o dilución.

6. Resultados- Discusión

6.1 Síntesis del polímero de impronta molecular para adsorción de metil benzoato.

El interés en desarrollar un MIP para adsorción de metil benzoato, partió de la necesidad de imitar la firma aromática de cocaína, compuesta principalmente de esa sustancia volátil, que el perro entrenado es capaz de interpretar como si se tratará de la sustancia de abuso (**Figura 7**).

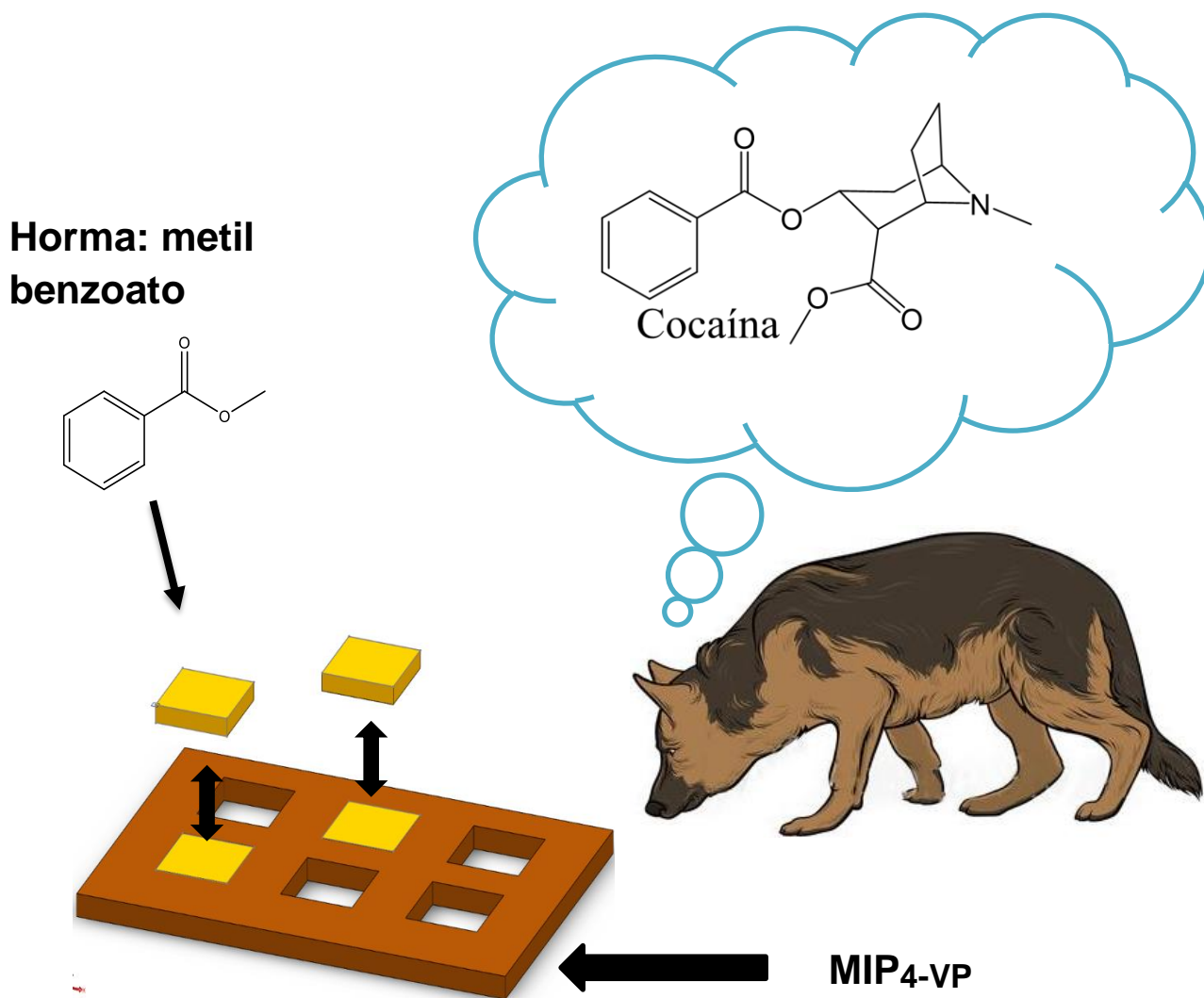


Figura 7. Uso del polímero MIP_{4-VP} como imitador de cocaína

La matriz polimérica del MIP-4-VP cuenta con poros específicos para adsorber metilbenzoato, molécula volátil que se desorbe y es identificada por el can como cocaína.

6.1.1 Síntesis del MIP4-VP para adsorción de metil benzoato

El monómero seleccionado para esta impronta fue la 4-vinil piridina, es un monómero de tipo básico Brønsted-Lowry, fue elegido dado que el nitrógeno en su estructura es capaz de actuar como donador de pares de electrones y su anillo de benceno es capaz de brindar el grado de hidrofobicidad requerido para interactuar con la molécula horma, metil benzoato.

La relación del monómero-entrecruzador-horma utilizada fue 4:20:1 puesto que es la más popular para la mayoría de los polímeros. La horma es quien genera el poro dentro de las cavidades, una vez extraída la horma se espera que permanezca el poro en la matriz polimérica; el monómero se coloca en exceso respecto a la horma para asegurar las interacciones y el entrecruzador se coloca en una alta proporción ya que forma la mayor parte del cuerpo del polímero. Las posibles interacciones que podrían darse entre monómero (en color azul) y horma se muestran en la **Figura 8**,

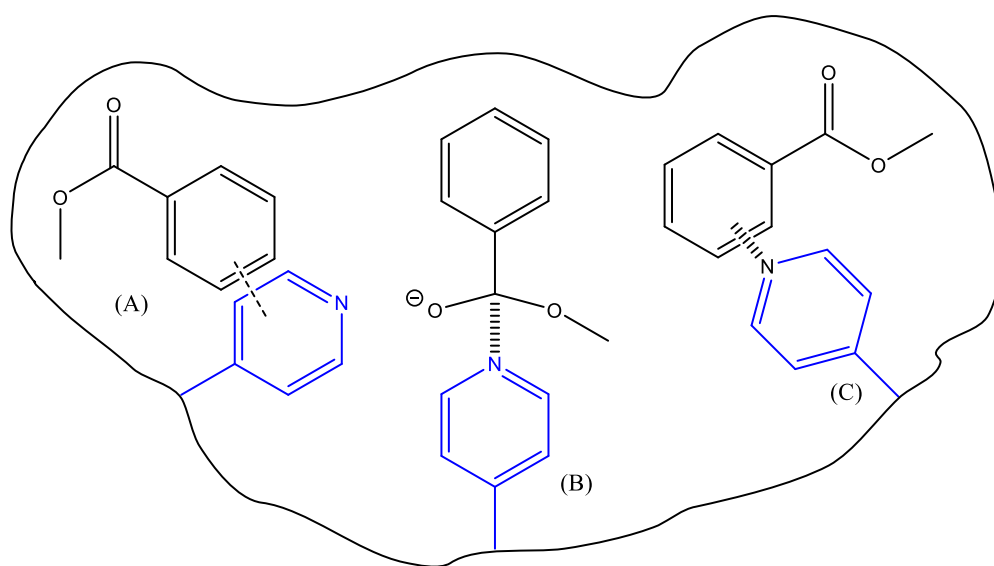


Figura 8. Posibles interacciones entre metil benzoato y 4-vinil piridina en la matriz polimérica

La letra (A) representa la interacción por enlaces tipo π - π ; la letra (B) a la interacción existente entre el par electrónico del nitrógeno y el carbono con el δ^+ del grupo carboxilo del metil benzoato; y la letra (C) a la interacción de los pares electrónicos del nitrógeno la de 4-VP con el anillo de benceno, favorecido por el ambiente electrostático que existe. La estequiometría de las interacciones horma: plantilla es desconocida y se requiere de otro tipo de análisis para su determinación.

La relación entre el entrecruzador EDGMA y monómero fue 20:1, por lo general, se utilizan relaciones de mayor reticulación para acceder a materiales porosos (tipo macroporosos) con permanente estabilidad mecánica.

En el caso de que fuerzas hidrofóbicas estén involucradas, en cuanto al monómero-horma, se sugiere el uso de solventes próticos o polares (Vasapollo et al. 2011), así se evita competencia con el medio y se favorece que la mayor parte de las interacciones ocurran entre monómero y horma. En este caso, se utilizó un solvente de polaridad media, acetonitrilo. El método final se llevó a cabo con volumen de 5 mL, dado que se requería un mayor grado de entrecruzamiento y un polímero más rígido, además de un mayor número de lavados para eliminar la horma totalmente.

Los polímeros fueron molidos y tamizados con el fin de homogenizar en tamaño y obtener resultados más reproducibles, en teoría, para controlar parámetros como área superficial y número de sitios con capacidad de reconocimiento molecular.

6.1.2 Espectrofotometría de infrarrojo de 4 vinil piridina y MIP_{4-VP}

A menudo, los estudios FT-IR se han utilizado para la caracterización de MIP mediante la evaluación de la incorporación de grupos funcionales en el polímero y la comparación entre los espectros de polímero y monómero funcional, para monitorear la disminución o desaparición de algunas señales, como es el estiramiento de doble enlace del carbono de un monómero, con funcionalidad vinilo, resultado de la polimerización del grupo polimerizable del monómero (Vasapollo et al. 2011).

En la **Figura 9** se observa 3 señales correspondientes al monómero y a los MIP_{4-VP} tanto con sustancias adsorbidas como sin ellas. En el espectro de vinil piridina, la señal de 3417 cm^{-1} corresponde al enlace C=C del grupo vinilo y que no se observan en los infrarrojos de MIP, se puede atribuir la pérdida del grupo vinilo ya que es donde ocurre la polimerización. En el caso del polímero, se obtiene una alargada e intensa señal en 1722 cm^{-1} , debido al grupo carbonilo (C=O) que corresponde al grupo éster del entrecruzador EGDMA. Para el caso del polímero cargado con metil benzoato, se observa una señal en 710 cm^{-1} que corresponde a la sustitución en el núcleo aromático. La señal en 1717 cm^{-1} representa al éster del metil benzoato, las dos bandas en 1276 y 1114 con los estiramientos asimétricos y simétricos del carboxilo.

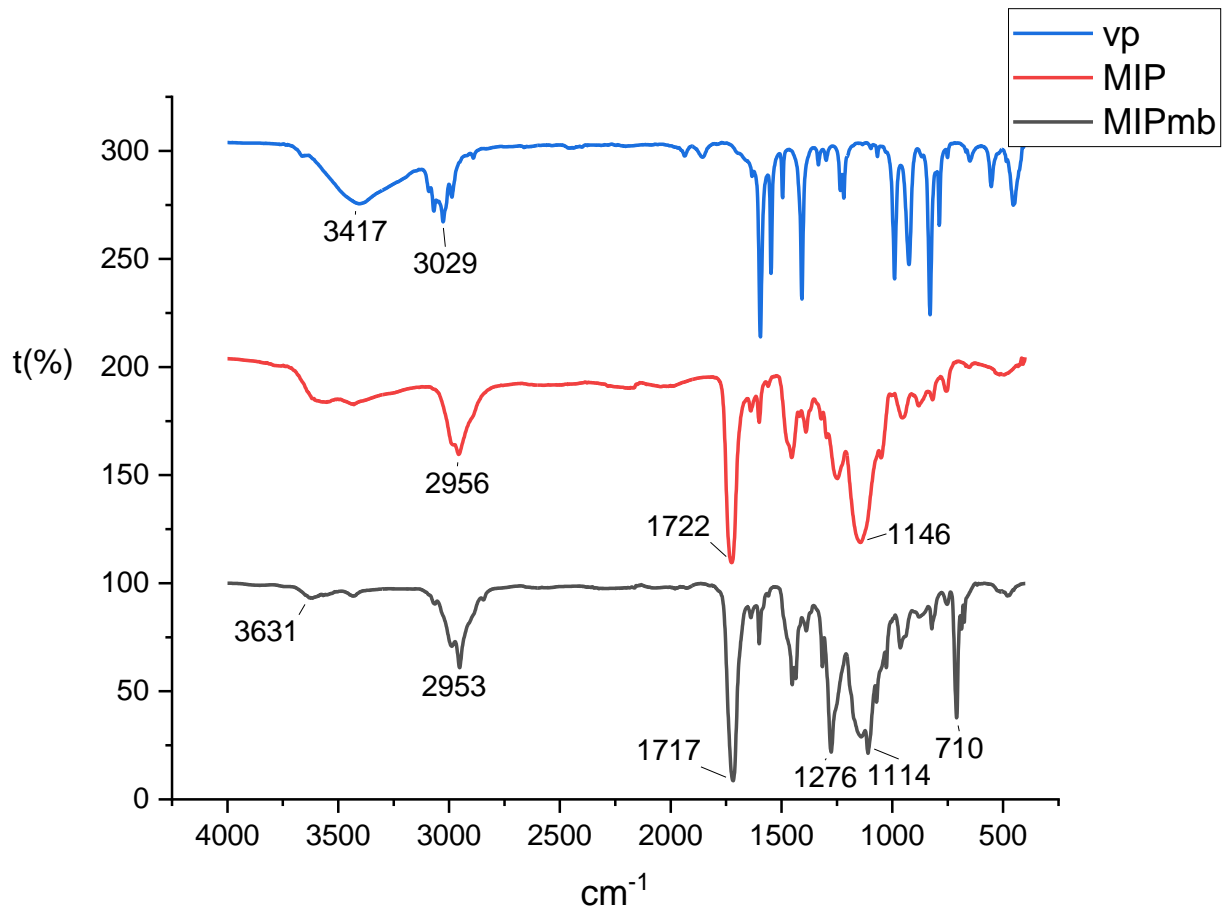


Figura 9. Espectros de infrarrojo de 4-vinil piridina y MIP_{4-VP}.

VP: vinil piridina(monómero); MIP: polímero de impronta molecular sin molécula plantilla y; MIPmb: polímero de impronta molecular adsorbida con metil benzoato (horma).

6.1.3 Estudios de la capacidad de adsorción de metil benzoato a MIP_{4-VP}

La capacidad de adsorción fue monitoreada por un método espectrofotométrico uv/visible, donde se utilizó una longitud de onda de 273.75 nm y las absorbancias fueron interpoladas a una curva de calibración (**Figura 10**).

La cantidad adsorbida, es interpretada como los mg de metil benzoato que pueden adsorberse por gramo de MIP_{4-VP}, se determinó sustrayendo la concentración final de la concentración inicial de la solución, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{[(\text{concentración inicial} - \text{concentración a } t^n) * (\frac{1.08 \text{ mg mb}}{1 \text{ ml}}) * \text{volumen en vaso}]}{g \text{ NIP/MIP}} = \frac{\text{mg adsorbidos}}{g \text{ MIP/NIP}}$$

Nota: El volumen debe ser corregido de acuerdo con el volumen que había en el tubo antes de la toma de muestra.

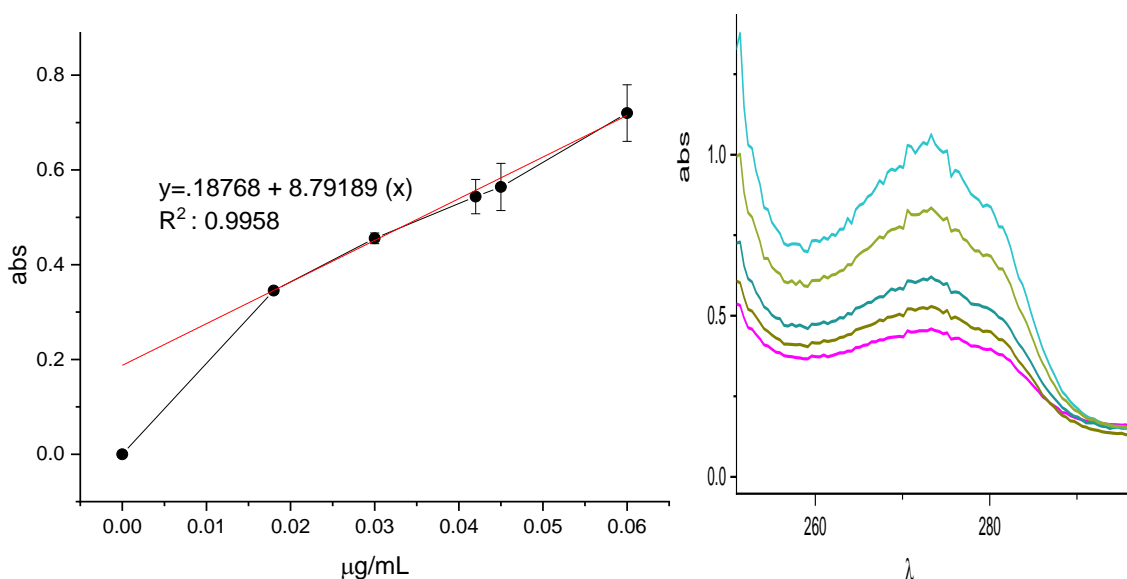


Figura 10. Curva y espectro de calibración de soluciones de metil benzoato en agua

Medidos a diferentes intervalos de concentración ($n = 3$). Las desviaciones estándar se representan como barras de error.

Los perfiles de adsorción de metil benzoato se llevaron a cabo utilizando una concentración inicial de metil benzoato a $0.6 \mu\text{L/mL}$, en agua destilada, puesto que se encuentra cercano al límite de solubilidad, lo que favorece la interacción MIP_{4-VP}-metil benzoato, como se muestra en el siguiente equilibrio:



Se probaron diferentes medios de dispersión para evaluar el comportamiento de adsorción del sistema metil benzoato-MIP_{4-VP}, el fenómeno se evaluó en agua destilada y en mezclas de disolventes de diferentes proporciones entre H₂O-MeOH

y H₂O-acetonitrilo, pero los resultados obtenidos sugieren que la hidrofobicidad del metil benzoato por el agua, desplaza su equilibrio hacia la adsorción a MIP_{4-VP} y la mezcla de agua con otros disolventes menos polares, provoca el traslado del equilibrio del metil benzoato a su estado en solución, ya que aumenta su solubilidad en el medio. Se utilizaron los 9 mL de volumen de solución dado proveyó concentración suficiente y permitió una agitación óptima.

Los estudios de capacidad de adsorción reflejaron que el polímero mostró una excelente capacidad para remover el metil benzoato del agua, pues prácticamente lo desorbió del agua en su totalidad, dando al polímero el uso alternativo de sorbente en procesos de remoción de aguas residuales. El polímero alcanza el equilibrio desde los 20 minutos, para comprobar los resultados se hizo un seguimiento durante tres horas. La gráfica puede observarse en la **Figura 11**.

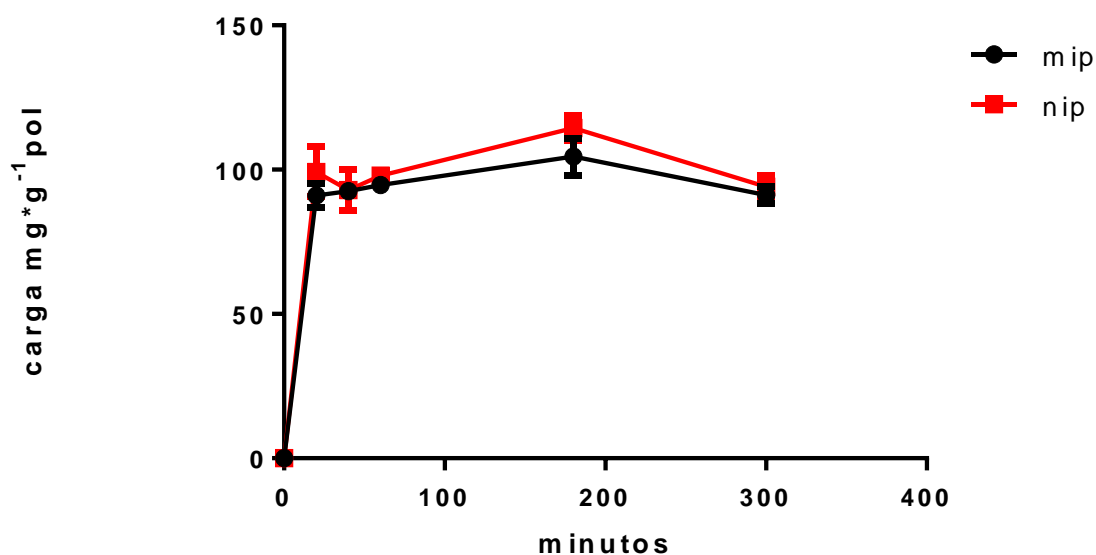


Figura 11. Perfil de adsorción de MIP_{4-VP} y NIP_{4-VP}

Medidos a diferentes intervalos de tiempo (n = 3). Las desviaciones estándar se representan como barras de error.

El equilibrio de adsorción se alcanzó en un período de tiempo relativamente corto, lo que implica una ventaja frente otros polímeros donde son requeridos tiempos más

largos de adsorción. Los valores registrados de máxima capacidad de adsorción son de $103.633\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para MIP_{4-VP} y $106.818\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para NIP_{4-VP}; estos resultados sugieren que la adsorción está dada por la afinidad entre el monómero y la molécula horma más que por el proceso de impronta. Posiblemente, la adsorción registrada se debe exclusivamente al área superficial del polímero, dado que el polímero se encuentra extensamente entrecruzado, existe poca porosidad y se sabe que el interior es donde existe la mayor parte del área de adsorción (EPA 1999). Cabe agregar que el efecto de la impronta en MIP es muy dependiente de la concentración, ya que el número de sitios con capacidad de reconocimiento molecular siempre es inferior a la cantidad con la que fue moldeado el polímero y se forma una gran área de polímero con una superficie no específica. Por esta razón, si se colocan cantidades altas de horma para adsorber en el polímero, primero se ocuparán las áreas moldeadas y luego las no específicas. Generalmente, a bajas concentraciones puede observarse el efecto de impronta, pero no a concentraciones moderadas o altas.

Adicionalmente, se efectuó una isoterma de adsorción para determinar la máxima capacidad de adsorción de los polímeros. Se graficaron distintas concentraciones contra su capacidad de adsorción (**Figura 12**). Se encontró que las más bajas concentraciones tardaron en saturar al polímero, cerca de 6 horas, mientras las más altas lo hicieron incluso durante las dos primeras horas. No obstante, se siguió monitoreando para confirmar que se mantuviera el equilibrio.

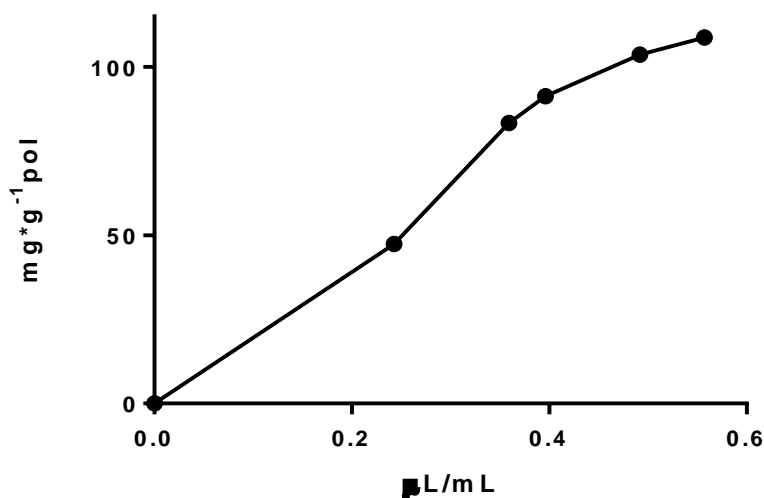


Figura 12. Isoterma de adsorción en polímeros MIP_{4-VP}

6.1.4 Extracciones de metil benzoato de MIP_{4-VP}

Con el fin de monitorear la cantidad remanente de la molécula horma en el polímero, una vez expuesto al ambiente, se desarrolló un método para la extracción del metil benzoato, adsorbido en las cavidades poliméricas del MIP_{4-VP}, mediante una mezcla agua/metanol y, que después se cuantificará por un método espectroscópico, esto por ser una técnica más sencilla y de menor costo. Para ello, se utilizó la proporción 1:1 (H₂O:MeOH), ya que el límite de solubilidad del metil benzoato en metanol, es 10 veces superior a la solubilidad de este en agua. Sin embargo, no se extrae exclusivamente en alcohol, ya que el metil benzoato en presencia de alcoholes como metanol, etanol, fenoles y sec-butanol, adicionan pequeñas señales a menores longitudes de onda, se ha confirmado que la intensidad de estas bandas depende de la concentración del alcohol (Hosoya, Tanaka, y Nagakura, 1962). De tal forma, se probaron diferentes proporciones de H₂O/MeOH hasta encontrar la que permitió visualizar, de forma adecuada, la longitud de onda en el espectro. Se propone que el equilibrio existente y las interacciones, dadas por puentes de hidrógeno, sean como se muestra a continuación (**Figura 13**).

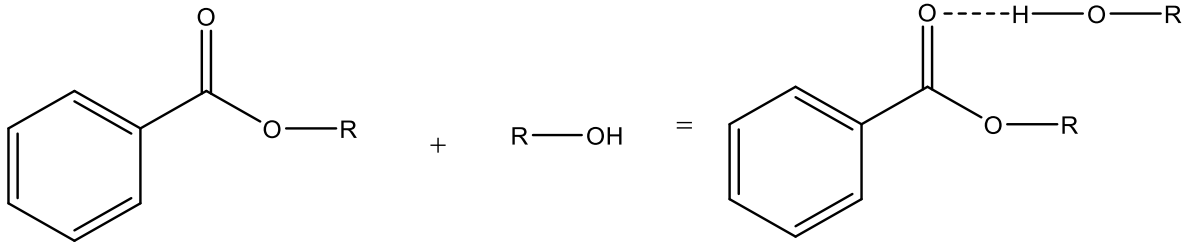


Figura 13. Probable equilibrio e interacción entre metanol y metil benzoato por puentes de hidrógeno.

Metil benzoato tiene 3 bandas de absorción sin embargo nos centramos en la última de ellas con λ 273.75 nm para realizar la curva de calibración (**Figura 14**).

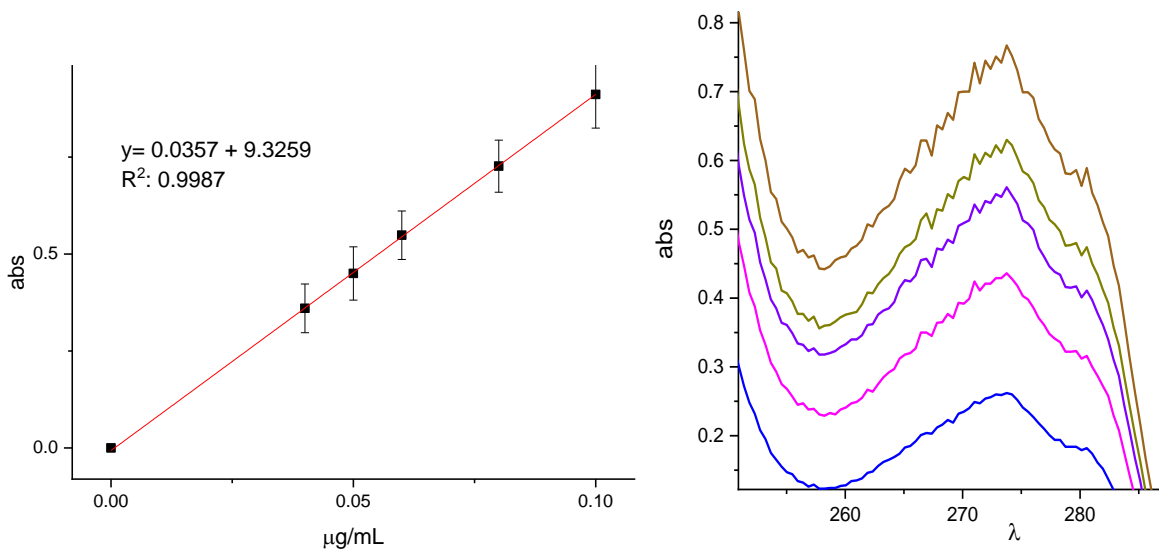


Figura 14. Curva de calibración metil benzoato en MeOH:H₂O

Medidos a diferentes intervalos de concentración (n = 3). Las desviaciones estándar se representan como barras de error.

Se encontró que la agitación es un factor limitante para obtener una extracción óptima ya que cuando las moléculas son agitadas, la energía cinética proporcionada la convierten en energía potencial y por ello, son capaces de superar las fuerzas de

atracción que las mantienen unidas a una superficie (EPA 1999). De igual forma la temperatura del proceso de extracción no debía ser mayor a la temperatura ambiente, ya que un aumento de esta favorece el paso de la molécula odorífera hacia el espacio de cabeza, debido a su baja presión de vapor, por ende, se observa una lectura con menor valor de concentración de metil benzoato respecto al valor real. Tras experimentos previos se determinó que se requiere de 3 lavados sucesivos de 20 mL de solución H₂O/MeOH proporción 1:1 para extraer el metil benzoato de la matriz polimérica y el tiempo de equilibrio calculado entre cada lavado fue de 2 horas.

Los valores de absorbancia obtenidos por cada lavado se interpolaron en una curva de calibración y fueron sumadas las concentraciones de metil benzoato extraído para obtener la concentración total.

Para calcular la cantidad adsorbida de metil benzoato a la matriz polimérica se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{[(\sum_{i=1}^3 i)] * V}{gMIP} = \frac{mgMB}{g MIP}$$

Donde i = Concentración por cada lavado.

Para calcular el porcentaje de la cantidad desorbida de la matriz polimérica se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%perdida: 100 - \left[\left(\frac{\text{cantidad adsorbida de MB total a } t^n}{\text{cantidad adsorbida de MB a } t=0} \right) * 100 \right]$$

6.1.5 La desorción del metil benzoato adsorbido a MIP_{4VP} en un sistema abierto

Los segmentos de entrenamiento de un can se establecen de los intervalos de los 20 a 40 minutos por 8 días (Almirall et al., 2012). Durante ese lapso se debe asegurar el tiempo operacional de los polímeros para entrenamiento, es decir, tener un estímulo de calidad por parte de la firma aromática.

Los polímeros comerciales son de fácil contaminación, ya que presentan afinidad por distintas especies volátiles, sin ser selectivas, por lo tanto, se recomienda utilizarlos en un ambiente controlado; también sufren de una rápida desorción. por lo que requieren ser almacenados correctamente (refrigeración), inmediatamente después de su uso; operación que no siempre puede asegurarse cuando se requieren realizar traslados.

Para estudiar la desorción del polímero, se llevó a cabo un estudio de estabilidad acelerada, como indica la NOM-073-SSA1-2005, que los define como estudios diseñados bajo condiciones exageradas de almacenamiento, por ejemplo, a altas temperaturas para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco o de un medicamento. El estudio se efectuó a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ya que se trata de un producto que se almacena en refrigeración. El experimento fue llevado a cabo durante 7 días, donde un lote del polímero se almacenó en un sistema abierto, a temperatura ambiente. El primer día se realizaron muestreos por triplicado al lote de polímero, cada hora en un intervalo de 0-9 horas, no obstante, no se registraron cambios entre la hora 0 y 6. Posiblemente las pérdidas registradas son tan pequeñas que no entran dentro del límite de detección del método elegido. Estos resultados son bastante alentadores ya que sugieren que el MIP_{4VP} es capaz de retener en su superficie la mayoría de las moléculas adsorbidas debido a su afinidad monómero-horma. Una vez transcurridas las nueve horas comienza una desorción promedio del 10% del metil benzoato adsorbido, a las 24 horas, se registra una desorción promedio del 12%, pero la mayor desorción

ocurre hasta las 48 horas, con el valor de 36%; en adelante la desorción se desarrolla en forma lenta como puede observarse en la **Tabla 5** y la **Figura 15**.

Tabla 5. Tabla de porcentaje desorbido de metil benzoato, durante 7 días.

<i>Días</i>	Promedio %pérdida de metil benzoato	Desviación estándar
9 h	10.15	16.137
1	12.42	15.772
2	36.32	2.248
3	36.94	3.101
4	46.35	3.613
7	49.12	2.536

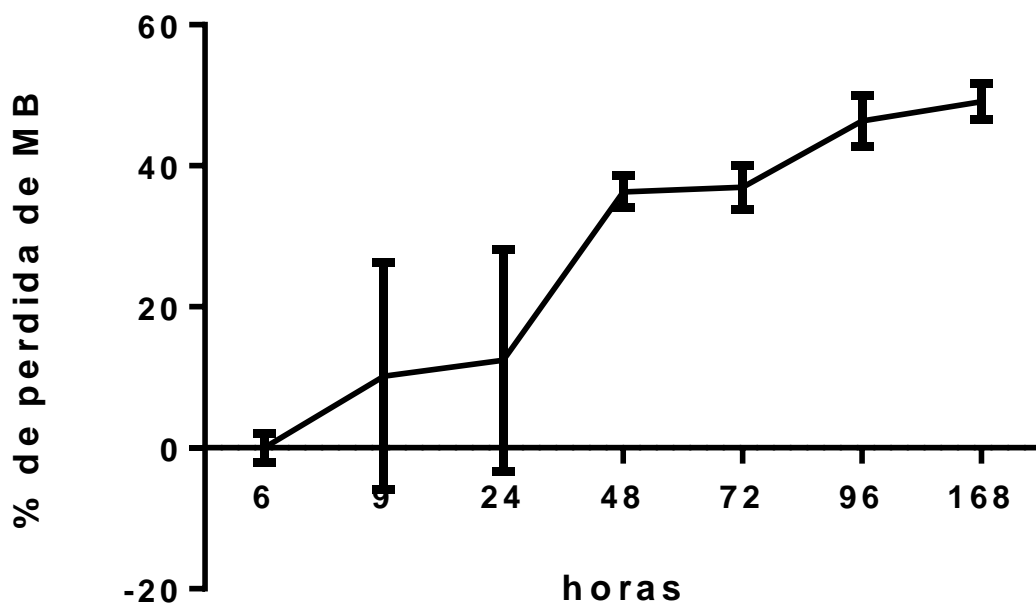


Figura 15. Pérdida de metil benzoato por 7 días %(m/m).

Medidos a diferentes intervalos de tiempo (n = 3). Las desviaciones estándar se representan como barras de error.

Los altos porcentajes de pérdida de metil benzoato en los primeros dos días del estudio puede ser debido a la desorción de la molécula en la capa superficial del

polímero. La rápida liberación puede explicarse con el acomodo del metil benzoato en multicapa o bicapas y este, al no estar asociado a una superficie, se desorbe rápidamente (Antonio Gutiérrez 2017).

A partir de las 48 horas en adelante, parece que se alcanza un equilibrio entre la cantidad de metil benzoato liberada y la cantidad de metil benzoato, adsorbida al polímero, e incluso se aprecia una liberación más lenta, pues al séptimo día sólo hay una diferencia de desorción de 12.8% de metil benzoato desorbido respecto a lo que se desorbió al segundo día, en este sentido podría creerse que la liberación está ocurriendo desde los sitios modelados o de impronta y no de las capas superficiales. La liberación modificada a partir de este punto puede deberse a las múltiples interacciones en la red de impronta esto porque posee numerosos residuos funcionales complementarios u orientados estéricamente que son capaces de interactuar con la molécula horma con mayor fuerza de unión.

La cantidad de metil benzoato que permaneció adsorbida en el MIP_{4-VP} expuesto al ambiente durante 7 días fue 216.7653 mg por gramo de polímero, más que suficiente para seguir condicionando o vinculando a los canes con algún tipo de respuesta. En la **Tabla 6** se muestra la cantidad que permaneció adsorbida durante dicho periodo de tiempo. Con base a estos resultados, se puede asegurar que el uso operacional del MIP_{4-VP} es de una semana y resulta superior, comparándolo con los imitadores de Sigma Pseudo^{MR}, quien reporta un uso operacional de 45 minutos

Tabla 6. Mg de metil benzoato adsorbido por gramo de MIP_{4-VP} a través del tiempo

Hora	mg /g	Desviación estándar
0	426.009	8.553
9	382.745	68.746
24	373.118	67.191
48	271.271	9.577
72	268.654	13.210
96	228.548	15.393
168	216.765	10.798

6.1.6 Almacenamiento

Las pruebas de almacenamiento consistieron en comparar tres diferentes condiciones: una del MIP_{4-VP} almacenado en un sistema abierto a temperatura ambiente y otras dos del MIP_{4-VP} almacenado en un sistema cerrado, una bajo condiciones de refrigeración (aproximadamente 7°C) y otro a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Además, para esta prueba, MIP_{4-VP} se comparó con otro adsorbente popular en el mercado, usado en imitadores de entrenamiento: gel de sílice, bajo las 3 mismas condiciones experimentales. Los datos obtenidos se encuentran en la **Figura 16**.

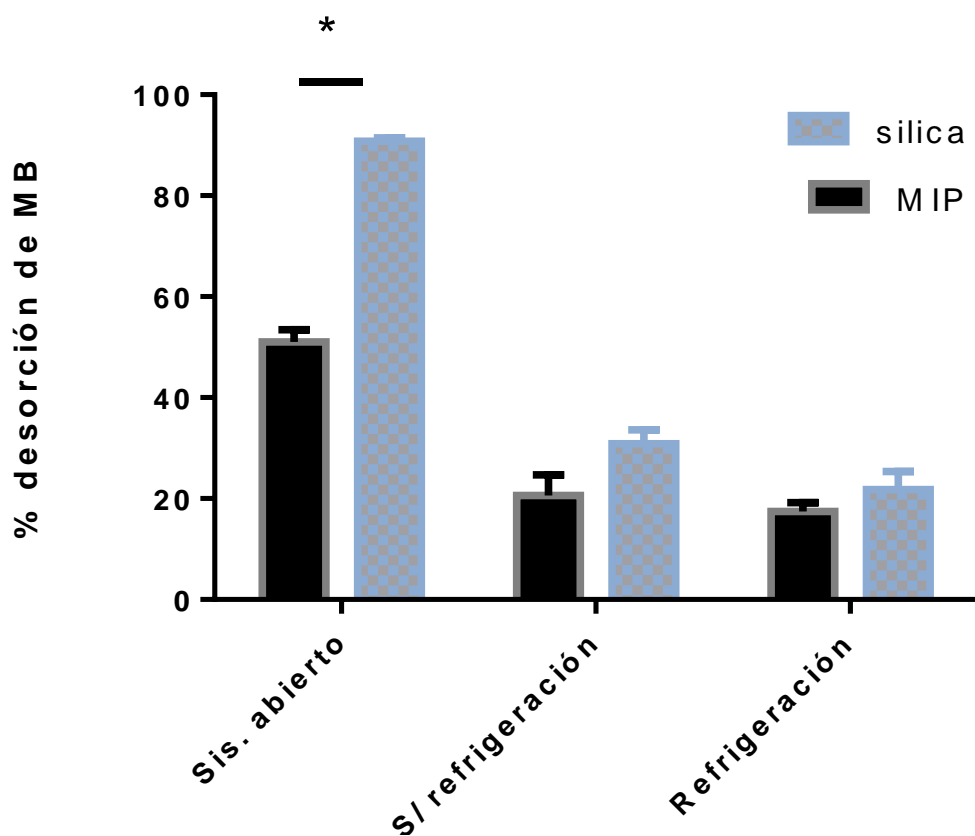


Figura 16. Pérdida bajo diferentes tipos de almacenamiento por 7 días.

Medidos a diferentes intervalos de tiempo (n = 3). Las desviaciones estándar se representan como barras de error. Elaborado en GraphPad Prism

Los resultados obtenidos sugieren que se precisa de un correcto almacenamiento pues, con exposición en un sistema abierto durante una semana, ocurrió la desorción del 49.17% de metil benzoato adsorbido a MIP_{4-VP} y en el caso del gel de sílice hubo desorción del 90.8% de metil benzoato. El resultado se evaluó mediante T de student obteniendo significancia $p < 0.005$ y se demostró una diferencia significativa entre la desorción en sílice y la desorción en el MIP_{4-VP}, bajo condiciones de almacenamiento extremo. Esto prueba que existe una mayor fuerza de unión con metil benzoato al MIP_{4-VP}, en comparación con la interacción de un adsorbente que no presenta especificidad hacia la especie volátil.

Los datos mostrados en la **Tabla 7** indican que la refrigeración es el método óptimo para conservar la integridad del producto, ya que las bajas temperaturas impiden que aumente la presión del vapor de la sustancia y que migre hacia su fase gaseosa. Pese a estas condiciones de almacenamiento, aún se presenta una desorción considerable por lo que se sugieren dos condiciones para promover la óptima estabilidad del producto, la primera sería acondicionar el producto en un envase un cierre hermético y la segunda sería el almacenamiento a temperaturas menores a la refrigeración.

Tabla 7. Comparación de porcentaje de desorción de MIP_{4-VP} contra gel de sílice.

Condición almacenamiento	MIP		Gel de sílice	
	% desorbido	D.E	%desorbido	D.E
Sistema abierto	49.117	2.535	90.810	0.677
S/ refrigeración	20.638	4.093	30.883	2.721
Refrigeración	17.493	1.682	21.768	3.594

Bajas tasas de desorción se registraron con el envase cerrado a temperatura ambiente y aún menores tasas de desorción en condiciones de refrigeración, para ambas sustancias adsorbentes estudiadas. Las pérdidas alrededor del 20% por

desorción en ambos adsorbentes, podría corresponder a la cantidad adsorbida de metilbenzoato en multicapas misma, que desorbe con facilidad. No obstante, en el caso del MIP_{4V-P}, sólo con el cierre dentro de un envase a temperatura ambiente, se registró una desorción de 17.49 % (m/m), similar al 20.64% que se obtuvo en refrigeración. Haciendo un análisis de varianza y la prueba post hoc Tukey ($p < 0.005$), para el lapso de una semana, se encontró que no había diferencia significativa entre la desorción del polímero en condiciones de refrigeración contra condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente. Por otro lado, para el gel de sílice sí existe una diferencia entre el almacenamiento en refrigeración y a temperatura ambiente, lo que se traduce como una condición de refrigeración imprescindible.

Dado esos resultados, se determina que el MIP_{4-VP} es superior en cuanto a estabilidad contra otros productos que deben refrigerarse inmediatamente después de su uso, por lo que, si fuese necesario trasladarse con el producto o no fuera posible refrigerarlo inmediatamente, no existiría problema alguno.

Los efectos observados indican que podría existir una liberación modificada por parte de la matriz polimérica, ya que se muestra una menor liberación a condiciones de almacenamiento extrema (en un sistema abierto a temperatura ambiente) comparado con sílice donde ocurrió una desorción casi por completo después de una semana de exposición. Esto lleva a pensar que el MIP_{4-VP} proveerá una mayor duración de la firma aromática durante los entrenamientos e incluso podrá ser utilizado en repetidas ocasiones, a diferencia del material en sílice que es la referencia y de la mayor parte de los productos comerciales.

6.2 Síntesis de polímero de impronta molecular para adsorción de ácido acetilsalicílico.

La finalidad de diseñar un MIP para ácido acetilsalicílico, recayó en emparar la formulación de imitación para heroína de Sigma Pseudo^{MR}, que contiene ácido acético y ácido acetilsalicílico, la segunda como una molécula de liberación retardada de ácido acético, en una matriz sólida higroscópica de celulosa microcristalina. El uso del MIP se muestra en la **Figura 17**.

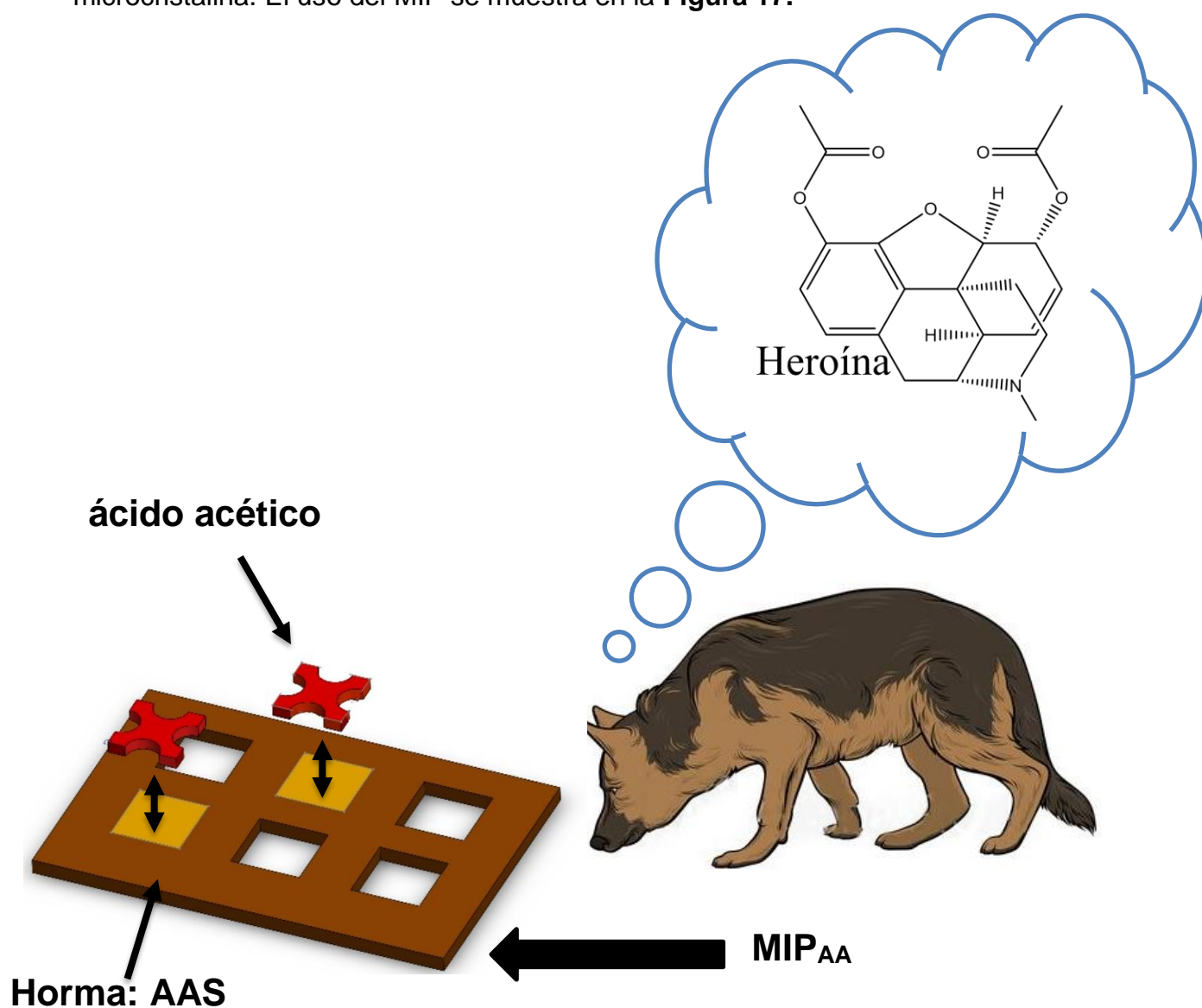


Figura 17. Uso del MIP_{AA} como imitador de heroína.

Si bien la mayor parte del espacio de cabeza de heroína consiste en ácido acético, los estudios generados por Macias (2009), encontraron que los perros reconocen como heroína a la combinación de ácido salicílico con ácido acético, por lo que se plantea diseñar un sistema de liberación modificada, ya que el ácido acetilsalicílico produce ácido acético como producto de degradación y deja el ácido salicílico, un compuesto que también es objetivo de rastreo para los perros. Las estructuras químicas se muestran en la **Figura 18**

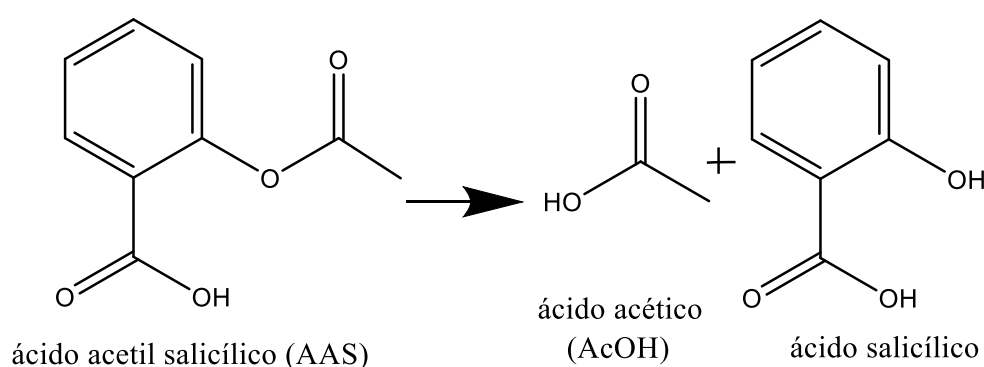


Figura 18. Degradación del ácido acetilsalicílico.

6.2.1 Síntesis de MIP_{AA} para adsorción de ácido acetilsalicílico.

La síntesis del polímero de impronta molecular se realizó utilizando el método de polimerización de Meischl et al. (2016), quien diseñó un MIP para remoción de AAS en sistemas acuosos.

Para la preparación del polímero, se utilizó AAS (como molécula horma), azobisisobutironitrilo (AIBN) como agente iniciador de la polimerización y la acrilamida (AA) como monómero junto con el dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) como entrecruzador. En referencia al monómero, el MIP sintetizado se nombró MIP_{AA}.

La molécula horma AAS, es una molécula hidrofílica, por lo que se requirió de monómero y un entrecruzador que pudieran reaccionar con esta de ahí la elección

del entrecruzador EDGMA (producto de la reacción de condensación entre dos equivalentes de ácido metacrílico y un equivalente de etilenglicol). Los dos grupos carbonilo de su éster quizá actúen como aceptor de enlaces de hidrógeno. Por otra parte, la acrilamida se seleccionó como monómero ya que en ambientes polares puede ocurrir la interacción entre AAS y acrilamida; se añadió en una proporción horma-monomero 1:6, el acomodo podemos verlo mostrado en la **Figura 19**. Tanto el monómero y entrecruzador de elección se ocuparon porque forman enlaces no covalentes de tipo puente de hidrógeno con el AAS. (Meischl et al. 2016). La proporción monómero-entrecruzador 1:5, se utilizó para obtener un polímero altamente reticulado con cavidades estables, para el reconocimiento de la horma. Como disolvente apropiado para la reacción de polimerización, se utilizó acetonitrilo, ya que no perturba la formación de enlaces de hidrógeno. El volumen final, se consideró un volumen de 5 mL de disolvente, ya que se buscaba un polímero altamente entrecruzado.

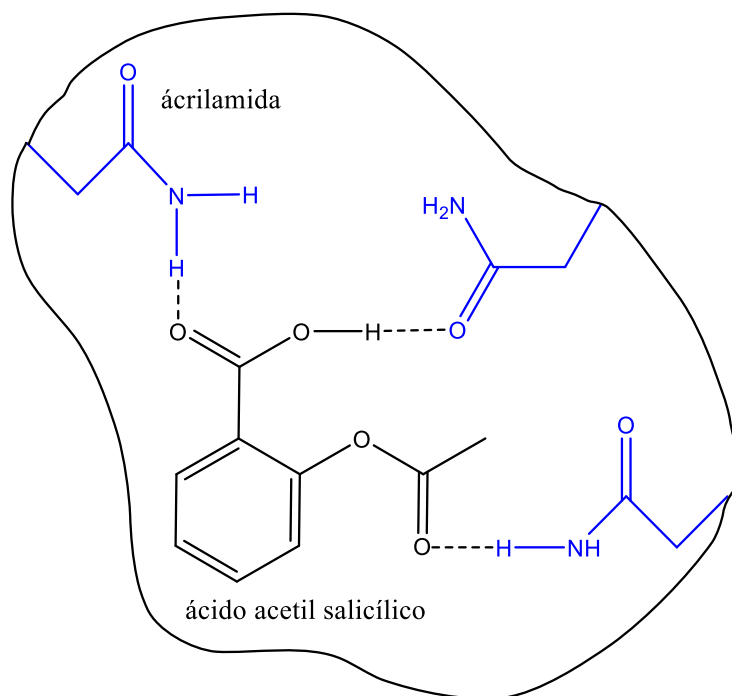


Figura 19. Posible interacción de enlace de hidrógeno entre el monómero acrilamida y AAS dentro de la matriz polimérica.

Después de la molienda del monolito resultante, el tamizaje se convierte en un paso determinante para homogenizar el tamaño de partícula y obtener resultados reproducibles.

6.2.2 Infrarrojo de acrilamida y MIP_{AA}

Se hizo un análisis de infrarrojo por ATR, de muestras de acrilamida y MIP_{AA}, (**Figura 20**) con el objetivo de comparar los espectros antes mencionados y con base a ello detectar la desaparición o aparición de bandas entre ambos espectros.

En el espectro de acrilamida, las bandas en 3352cm^{-1} y 3615cm^{-1} corresponden a las aminas Tensión N-H: Las aminas primarias presentan dos bandas (simétrica y asimétrica), corresponden a un grupo polimerizable de la acrilamida por lo que lleva a pensar que interactúa con el entrecruzador y es por lo que se aprecia su desaparición en el infrarrojo correspondiente al polímero. En el espectro del polímero observamos una banda en 1728cm^{-1} que corresponde al grupo C=O carbonilo del entrecruzador EDGMA, característicos de un grupo éster y que también se empalma a la señal del éster, del grupo acetil del AAS, esto debido a que bajo la técnica de infrarrojo no es posible observar la unión del MIP_{AA} a AAS pues la cantidad del fármaco es muy baja y es ocultada por señales de moléculas que están en mayor proporción.

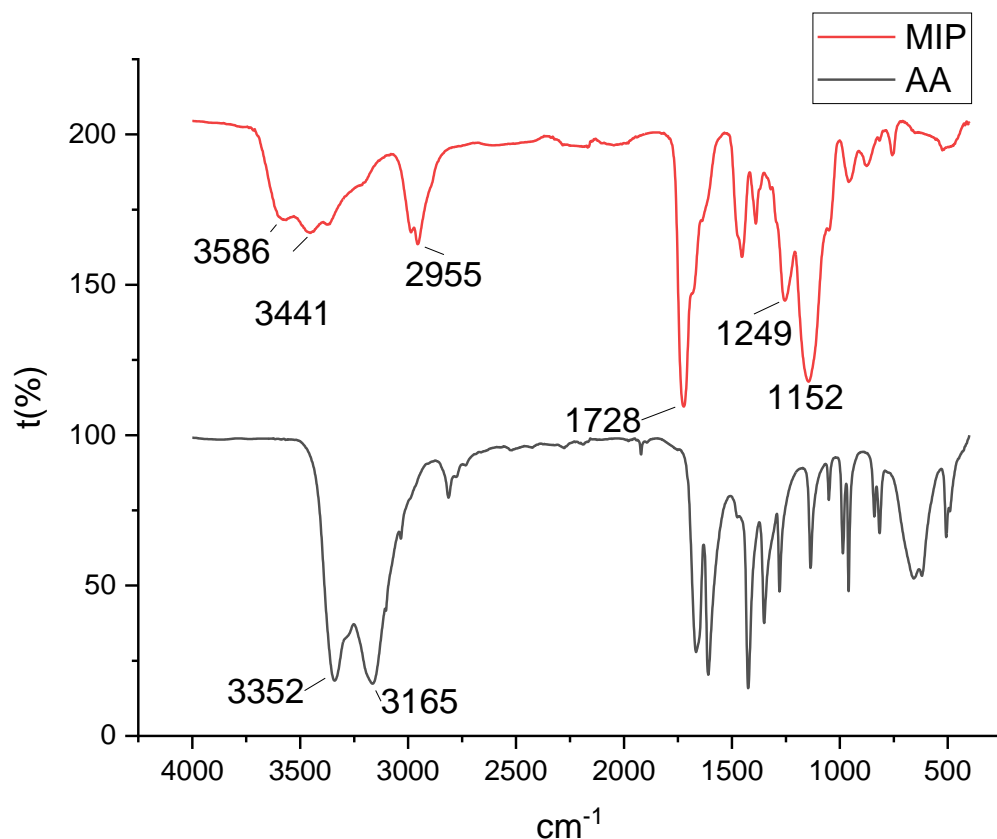


Figura 20. Espectros de infrarrojo de acrilamida y de polímero MIP_{AA}

AA: monómero acrilamida. MIP_{AA}: polímero de impronta molecular de acrilamida

6.2.3 Estudios de adsorción de AAS a MIP_{AA}

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la máxima capacidad de carga o adsorción que tenía el polímero. En comparación al artículo de Meischl et al. (2016), las lecturas de los perfiles de adsorción se realizaron con un espectrofotómetro UV en lugar de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución. Los valores de absorbancia fueron interpolados en una curva de calibración (**Figura 21**).

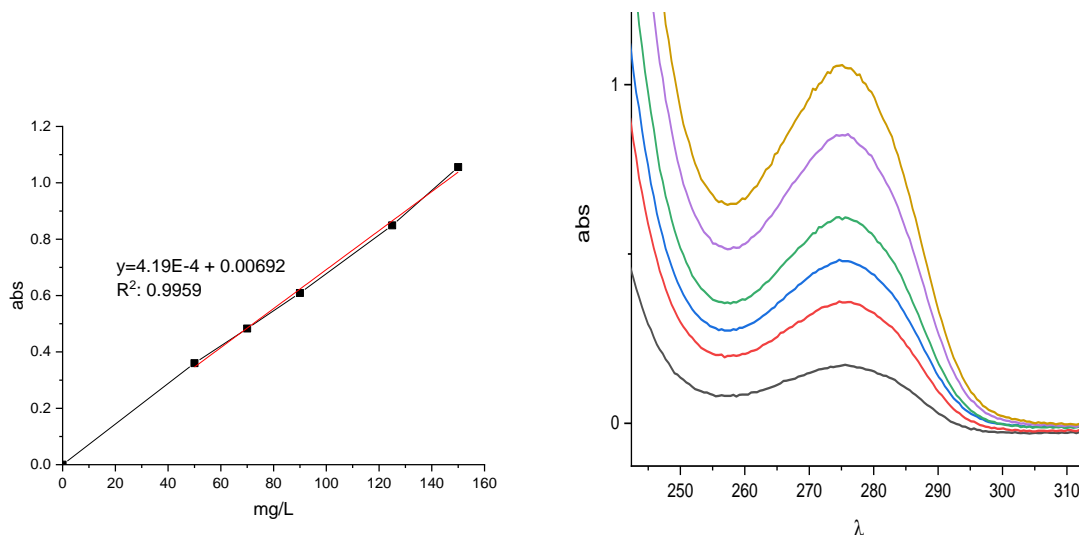


Figura 21. Curva de calibración de AAS en agua ajustada pH=3

El medio utilizado fue agua destilada ajustada a pH=3, para asegurar que la mayoría de las moléculas de AAS estén protonadas en el medio (pKa de AAS es 3.49), como se muestra en la **Figura 22**.

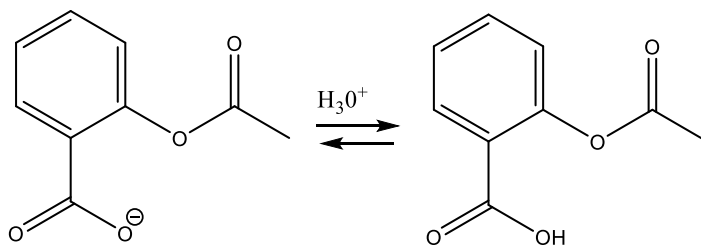


Figura 22. Protonación del ácido acetilsalicílico en medio ácido

Se realizó un estudio de adsorción a pH neutro utilizando las mismas concentraciones estándar para evaluar su capacidad de carga, también llamada capacidad de adsorción, sin embargo, las capacidades de carga fueron muy bajas y se siguió trabajando con pH ácido. Esto es consistente con las observaciones realizadas por Haupt, Dzgoev, y Mosbach (1998) donde demuestra que a un menor pH los compuestos ácidos tienen una mayor capacidad de carga a polímeros con monómeros con un átomo de nitrógeno en su estructura .

Generalmente, para hormas solubles en solventes polares, no se recomienda el uso de medios polares en estudios de adsorción, ya que el medio entra en competencia por las interacciones de la horma y monómeros. En este sentido, se realizó el experimento de adsorción descrito en la metodología, pero usando como medio una mezcla 9:1 agua:acetonitrilo, con el fin de disminuir un poco la polaridad del medio, no obstante, los resultados no mostraron mejora de la capacidad de adsorción con este cambio de disolvente, como se muestra en la **Figura 23**, por ello se determinó utilizar el medio de agua destilada con pH ajustado a 3.

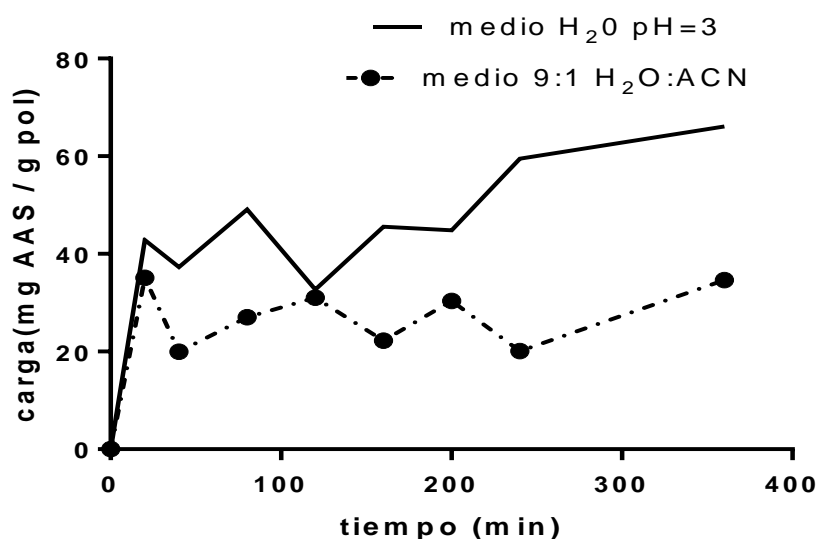


Figura 23. Comparación de perfiles de adsorción de MIP_{AA} en diferentes medios

Los resultados mostraron que existe una relación entre las concentraciones de AAS y su capacidad de carga, el incremento en las concentraciones resulta en una mayor capacidad de AAS adsorbido al polímero. La solución de ácido acetilsalicílico seleccionada para las adsorciones fue de 1000 mgL⁻¹ esto dado que se encontraba cerca del límite de solubilidad donde, si bien existía la interacción agua-AAS también se veía favorecido el equilibrio AAS-polímero. Concentraciones menores no permitieron una completa saturación. Esto se muestra en el siguiente gráfico (**Figura 24**).

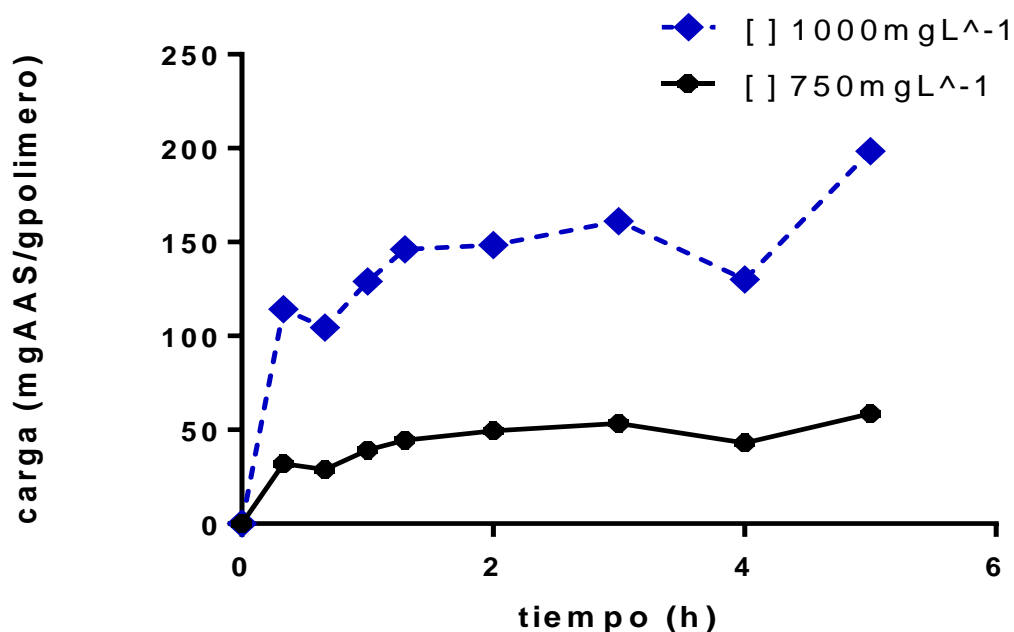
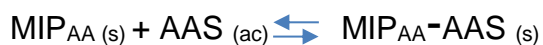


Figura 24. Comparaciones en capacidades de adsorción a diferentes concentraciones en disoluciones de AAS en pH=3.

No se realizaron estudios de adsorción a una temperatura mayor a 25°C, debido a que en el estudio de Meischl et al. (2016) se observó una aceleración de la degradación de AAS a partir de temperaturas mayores a 40°C. Los resultados del presente trabajo mostraron que la máxima capacidad de carga se observaba al cargar 20 mg de polímero y al agregar 9 mL de una concentración de 1000 mgL⁻¹, durante 7 horas en los multiagitadores magnéticos a 25°C. Una cantidad menor de polímero junto con un mayor volumen de solución conducían a resultados irreproducibles ya que, por una parte, las pérdidas de polímero entre toma de muestra eran significativas y por otra, un mayor volumen no permitió una agitación uniforme entre el polímero y la solución; otra situación crucial fue el filtrado para separar restos de polímero de la muestra líquida para su correcta lectura.

El equilibrio de adsorción de AAS, en solución, en el MIP_{AA}, se muestra en la siguiente reacción:



Dicho equilibrio se registró a las 7 horas de iniciado el estudio de adsorción, el valor de absorbancia registrado a las 24 horas era prácticamente el mismo y por ello, no se incluyó en las gráficas mostradas en la **Figura 25**. Para fines de evaluar el proceso de impronta se comparó el MIP_{AA} contra el NIP, ambos registraron valores similares de máxima capacidad de carga 121.237 y 133.961 mg de AAS por gramo de polímero, respectivamente. La falta de especificidad podría explicarse en el sentido que no todas las moléculas y grupos funcionales estaban protonados, y la unión selectiva a través de los enlaces de hidrógeno fue suprimida por otras interacciones. Pese que lo esperado era encontrar una capacidad de carga superior en el MIP_{AA} para evaluarlo se debió utilizar concentraciones más bajas.

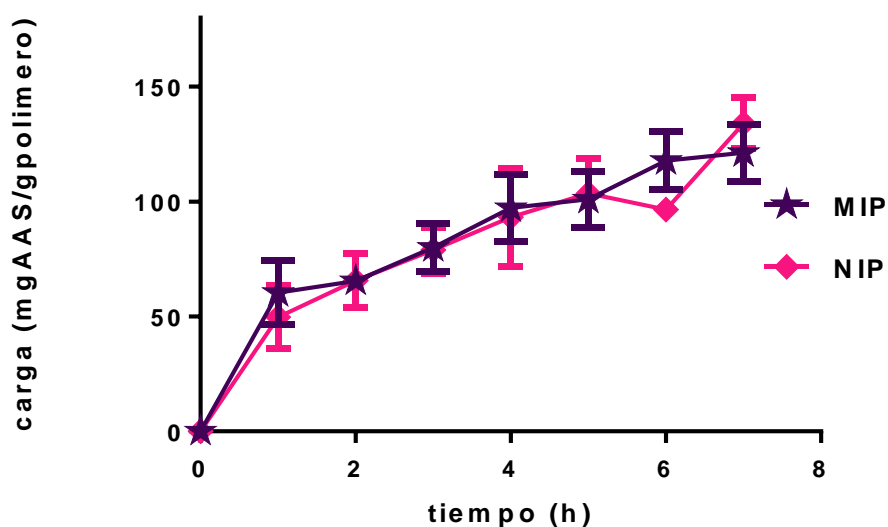


Figura 25. Perfiles de adsorción de AAS de MIP_{AA} y NIP_{AA}

Medidos a diferentes intervalos de tiempo (n = 3). Las desviaciones estándar se representan como barras de error.

El valor de máxima capacidad de carga de ácido acetilsalicílico registrado, es de 121.237 mg por el MIP_{AA} lo que corresponde alrededor del 12% de la superficie de un gramo de polímero, lo cual no produce suficiente ácido acético (AcOH) como producto de degradación de forma inmediata, para que pueda tener el uso que se

buscó dar a futuro en este proyecto. Por ello, se tomó la decisión de adsorber en MIP_{AA} ácido acético y que el AAS funcionará como una liberación retardada de ácido acético.

Al realizar los estudios para cromatografía de gases, se utilizaron como referencias muestras de gel de sílice con ácido acético adsorbido en su superficie, durante los ensayos y al estar en contacto los polímeros y el sílice, se observó que el MIP_{AA} era capaz de adsorber las moléculas de AcOH en su superficie por simple exposición a vapores e incluso eran capaces de retener el aroma por días. Esto podría explicarse tomando en cuenta que existen uniones de puente de hidrógeno similares entre el monómero acrilamida-AAS y acrilamida-AcOH, ya que interactúan los mismos grupos funcionales, ver **Figura 26**. Esta propiedad da pie a una probable liberación modificada ya que las moléculas liberadas de ácido acético están en un constante equilibrio con la superficie polimérica, como se aprecia en el siguiente equilibrio:

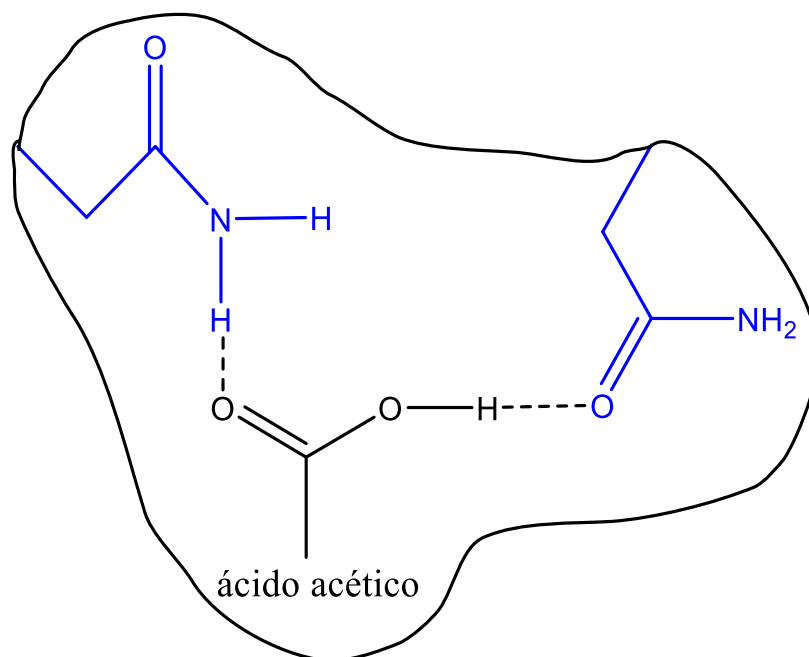


Figura 26. Posible interacción de enlaces de hidrógeno del monómero acrilamida con ácido acético dentro de la matriz polimérica.

Se sugirió la posibilidad de reusar el polímero, pues se conoce que estos materiales poliméricos pueden reutilizarse varias veces sin perder el "efecto memoria". (Olof Ramström, et al. 2001), lo que ofrece una opción sustentable al reducir la generación de residuos. En el artículo publicado por Meischl et al. (2016) argumenta que este polímero de acrilamida es capaz de regenerarse seis veces recuperando la misma capacidad de adsorción.

6.2.4 Estudios con cromatografía de gases por técnica de "Head Space" para identificación de ácido acético.

Los estudios de cromatografía por Head Space se desarrollaron para cuantificar ácido acético, ya que es el compuesto volátil principal en el espacio de cabeza de muestras heroína y producto de degradación del ácido acetilsalicílico. Se probaron diferentes técnicas de muestreo de Head Space para encontrar un método de cuantificación adecuado que permitiera medir la liberación de ácido acético de las matrices poliméricas MIP_{AA} elaboradas. La solución más efectiva para liberar analitos de su matriz es la desorción térmica, con varias ventajas, como: proporcionar suficiente energía cinética (para escapar las moléculas volátiles de su matriz), mejorar la transferencia de masa (para pasar a través de la matriz) y aumentar su concentración en el espacio de cabeza, mediante aumento de su presión de vapor (Ghiasvand y Hajipour 2016).

A la fecha existen pocas publicaciones sobre técnicas de Head Space para extraer ácido acético de matrices sólidas. Los sólidos tienden a tener poca homogeneidad en la muestra, por ende, poca reproducibilidad en sus análisis. Se siguió el método reportado por (Angela et al. 2014) para soluciones líquidas, donde se equilibró un vial sellado con la muestra problema a 85°C durante 10 minutos, en un baño de aceite, pese a que la temperatura de ebullición de AcOH está reportada a 118°C, se equilibra con temperaturas menores ya que el aumento de la temperatura está directamente relacionado con un aumento de la presión, lo que podría causar la ruptura del vial y poner en riesgo al analista. Se probaron menores tiempos de

equilibrio, pero la simetría del cromatograma disminuyó por lo que se descartó esa posibilidad. Tras diversos ensayos no se consiguió un método reproducible, ya que los valores de área cambiaban invariablemente, aun en muestras líquidas donde existe más homogeneidad. Cabe mencionar que no se alcanzó una simetría mínima de 0.8 como indica la farmacopea. En primera instancia, la operación manual de la jeringa carece de la precisión lograda por el control instrumental, además de que se pierde vapor de la jeringa cuando se retire del vial, existe un énfasis en este punto, ya que no se contó con una jeringa hermética o *gastight*, en su lugar, se selló con grasa de vacío entre el embolo y el cuerpo de la jeringa. Por aquella razón, se determinó utilizar esta técnica, exclusivamente como una herramienta de detección y no de cuantificación.

Se analizaron muestras de ácido acético puro por inyección directa, así como por Head Space, para corroborar que coincidieran los tiempos de retención. Para el análisis de AcOH puro se utilizó la Técnica de Evaporación Total, en la que se coloca una cantidad muy pequeña de ácido acético (10 μ L) en un vial sellado y equilibrado a una temperatura cercana al punto de ebullición, con la finalidad de evaporar la muestra completamente y tomar con la jeringa el ácido acético en su fase gas. Se puede observar en la **Figura 27** dos señales una de gran intensidad con tiempo de retención a 2.250 min que corresponde a ácido acético. Y otra señal de menor tamaño con tiempo de retención de 1.60 min, que corresponde a etanol usado en los lavados de la jeringa. De la misma forma, se realizó una comparación de inyección de etanol en inyección directa y por Head Space para comparar los tiempos de retención y verificar que se trataba de la misma sustancia.

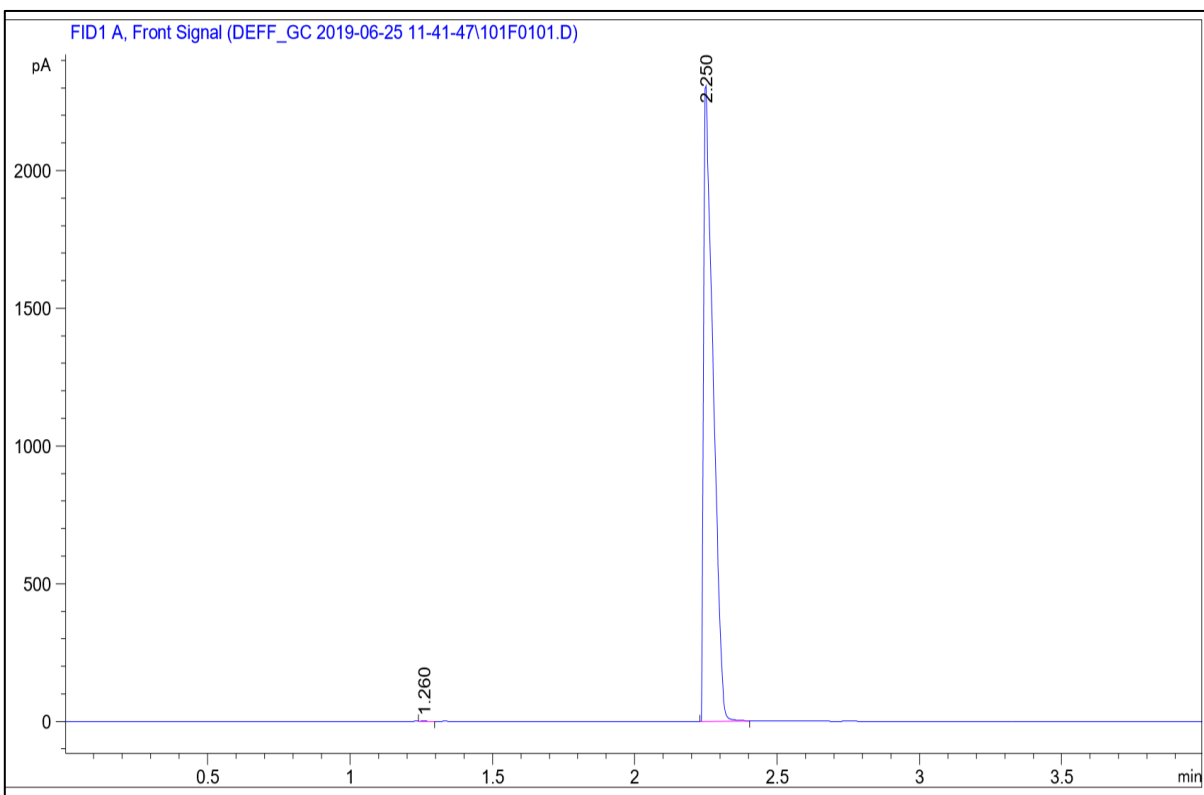


Figura 27. Compuestos en el espacio de cabeza de una muestra de ácido acético.

También se analizaron muestras de MIP_{AA} con ácido acético adsorbido a su superficie (**Figura 28**) donde se puede observar que ocurrió una liberación de ácido acético dominante en su espacio de cabeza, la señal de mayor intensidad con un tiempo de retención de 2.274 min. En el mismo cromatograma se aprecian otras señales, las cuales podría tratarse de impurezas asociadas a los reactivos con los que se llevó a cabo la polimerización.

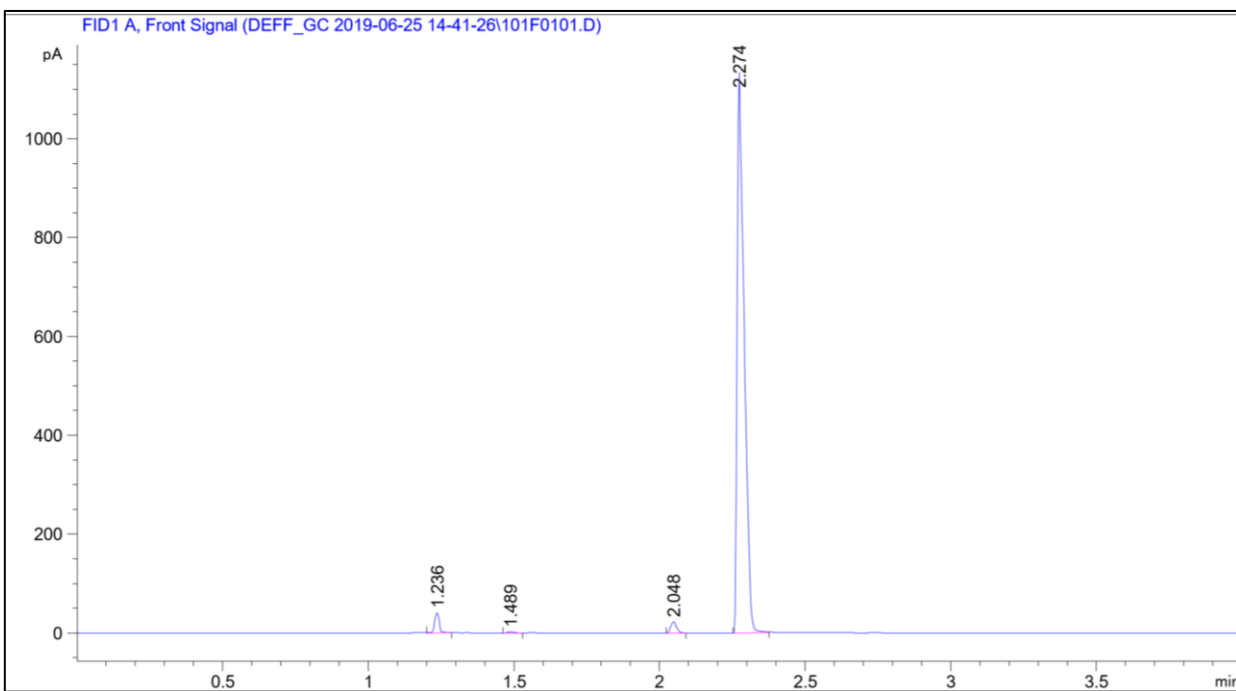


Figura 28. Compuestos encontrados en el espacio de cabeza de una muestra de MIP_{AA}.

Si bien puede existir un problema en el futuro, donde el olor propio del MIP_{AA} interfiriera en los entrenamientos, algunas marcas comerciales entregan “blancos” de sus productos, es decir, las matrices sin ninguna molécula adsorbida y es posible entrenar al can para sea capaz de discernir entre blancos y los volátiles objetivos.

6.2.5 Pruebas en perros realizadas por Facultad de Veterinaria

Método: se adsorbió ácido acético en concentraciones de 1-20% (v/p) a 1 gramo de MIP_{AA}, la carga se realizó sumergiendo las soluciones en acetona y se dejó evaporar el solvente 24 horas. Una vez secas las matrices, se colocaron en frascos ámbar y tapadas hasta su uso, en refrigeración.

En una habitación cerrada, se colocó aleatoriamente, el frasco en uno de varios nichos incrustados en la pared, posteriormente se ingresaron a 2 perros entrenados en detección de heroína con Pseudos de la marca Sigma a la habitación con el fin de rectificar que relacionaran el nicho con polímero como heroína. (**Figura 29**).



Figura 29. Entrenamiento de búsqueda de heroína con MIPAA

Los resultados indicaron que desde las adsorciones de 1% (v/p), los perros mostraron una respuesta, sin embargo, a concentración de 10% (v/p) la detección era más rápida y certera en 2/2 perros, no se prosiguió con concentraciones mayores ya que la respuesta buscada es suficiente con el 10% (v/p). Este porcentaje está relacionado con la máxima capacidad de adsorción del polímero que es el 12%, por lo que se asevera que dicha capacidad de carga de AcOH es suficiente para generar un estímulo en el can. De lo anterior se propone para la formulación del producto de imitación de polímero de impronta, que debe estar conformado por un mayor porcentaje de polímero adsorbido con ácido acético y otro porcentaje pequeño adsorbido con ácido acetilsalicílico, con el fin de que en una posterior degradación también se contribuya a la generación de gases de ácido acético. Sería conveniente obtener un método para medir la liberación y con esto poder determinar los porcentajes adecuados necesarios para generar la formulación óptima.

6.2.6 Toxicidad de polímeros acrilamida

Poliacrilamida es todo aquel polímero en el que se involucre la acrilamida como monómero. El monómero de acrilamida residual es probablemente una impureza en la mayoría de las preparaciones de poliacrilamida, que va desde >1 ppm a 600 ppm, no obstante, los efectos neurotóxicos se observaron en humanos solo a altos niveles de exposición (Exon 2006). La poliacrilamida en sí no es significativamente tóxica. Por ejemplo, un estudio de toxicidad oral aguda de poliacrilamida en ratas informó que se toleraba una dosis oral máxima única de 4.0 g / kg de peso corporal. En estudios de toxicidad oral subcrónica, las ratas y los perros tratados con poliacrilamida a dosis de hasta 464 mg / kg de peso corporal, no mostraron signos de toxicidad. Varios estudios de toxicidad oral crónica de 2 años en ratas y perros alimentados con dietas que contienen hasta 5% de poliacrilamida no tuvieron efectos adversos significativos (Andersen 2005). Esta información es útil ya que, algunas técnicas de entrenamientos consisten en dar a morder los imitadores de entrenamiento, por lo cual la ingesta accidental del polímero, por parte del perro no representa un peligro para él.

6.3 Acondicionamiento de MIP's

El producto final es una matriz en polvo, que brinda la ventaja de dosificar la cantidad de polímero a utilizar ya que una de las técnicas de entrenamiento canino consiste en adiestrar al perro para que rastree desde pequeñas cantidades hasta proporciones mayores.

La mayor parte de los productos comerciales posee envases designados a salvaguardar la integridad de su producto con cierres herméticos que eviten la contaminación y la desintegración como son: acero inoxidable, el politetrafluoroetileno (PTFE), copolímero de tetrafluoroetileno hexafluoropropileno (Teflon TM), el fluoruro de polivinilo (Tedlar TM), copolímero de éster politereftalico (Nalophan NA TM) y vidrio, ya que son considerados inertes e inodoros.(NSAI 2003).

El diseño de envase primario, para los productos propuestos en el presente trabajo, está pensado como una lata metálica, que en la parte superior posea una malla metálica de aproximadamente 250 micras, que permita la permeación de los volátiles y a su vez evite la pérdida de polvos durante su manipulación.

7. Conclusiones

Se llevó a cabo la síntesis de polímeros de impronta molecular para imitar los espacios de cabeza de dos sustancias de abuso. El MIP_{4-VP} para imitar cocaína y el MIP_{AA} para simular heroína.

El MIP_{4-VP} resultó tener excelente capacidad para remover el metil benzoato de medios acuosos, por lo que podría tener un uso alterno para remoción de residuos ya que en 20 minutos consigue el equilibrio, lo que incluso permitiría un uso industrial.

La capacidad de adsorción de metil benzoato en medios acuosos fue de 103.633 mg/g de polímero. En cuanto a su estudio de desorción se encontró que el polímero podía llegar a tener un uso operacional de hasta 7 días, tiempo sumamente superior a la competencia, que consigue un uso operacional de 45 minutos. Lo que implica que el producto elaborado puede reusarse por un largo periodo de tiempo si se almacena correctamente después de usarse. Los estudios de estabilidad mostraron que en una semana no hubo diferencia de desorción entre el MIP_{4-VP} almacenado en refrigeración y almacenado a temperatura ambiente, lo que brinda la ventaja de ser un producto que permite traslados y almacenaje sin refrigeración obligada. Las comparaciones con gel de sílice mostraron que la unión que existe entre el MIP_{4-VP} y el metil benzoato, es de mayor fuerza que la interacción con el adsorbente usado comercialmente, de modo que el MIP_{4-VP} ofrece una matriz más duradera y de lenta liberación de la firma aromática.

El MIP_{AA} tuvo la capacidad para adsorber AAS y AcOH, este segundo tanto en solución como en fase gas, punto positivo, ya que asegura que al liberarse el ácido acético de la matriz es capaz de regresar a la misma y con ello prolongar el tiempo

útil del polímero. Se propone una mezcla de MIP_{AA}, al que se adsorba AcOH y AAS para condicionar correctamente a los canes sobre la presencia de heroína. Los estudios con perros prueban que adsorber un 10% (v/p) de ácido acético por gramo de MIP_{AA} genera una rápida respuesta en los perros entrenados. Si bien la liberación de ácido acético no pudo ser cuantificada por “Head Space”, se desarrolló una técnica que permite visualizar los espacios de cabeza de las muestras de MIP_{AA} en forma cualitativa.

Durante la evaluación del proceso de impronta no se encontraron cambios significativos por lo que se asocia que la adsorción, a la matriz polimérica, por la afinidad entre el monómero y hormona para ambos MIP.

7.1 Prospectivas

La cuantificación de la liberación de ácido acético del MIP_{AA}, puede ser mejorada teniendo un cromatógrafo de gases que permita la cuantificación de espacio de cabeza preferentemente automatizado y que incluya con una jeringa de tipo Gastight.

Los polímeros de impronta molecular requieren algunos análisis químicos en el que se estudie su espacio de cabeza, con técnicas que permitan concentrar los volátiles que no se logró registrar por la técnica utilizada en este trabajo de tesis experimental. Se puede emplear la extracción de fase sólida acoplada a cromatografía de gases, lo que sería útil si la muestra se procesa por espectrometría de masas, para determinar si la matriz polimérica libera algún tipo de sustancia volátil y poder identificarla.

Los polímeros deben ser probados en perros para determinar los límites de detección y para determinar la duración de un estímulo de calidad en función de la desorción del polímero.

8. Bibliografía

- (NSAI)The National Standards Authority of Ireland. 2003. «Determination of odour concentration by dynamic olfactometry». *EN13725*.
- Almirall, Jose, Patty Diaz-Guerra, Howard Holness, y Kenneth Furton. 2012. *Field Detection of Drugs and Explosives by SPME-IMS*.
- Andersen, Alan. 2005. «Amended Final Report on the Safety Assessment of Polyacrylamide and Acrylamide Residues in Cosmetics¹». *International Journal of Toxicology* 24(2_suppl): 21-50.
- Angela, Maria et al. 2014. «Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE)». *American Journal of Analytical Chemistry* 5: 406-14.
- Antonio Gutierrez, Leticia. 2017. «Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas con polímeros de impronta molecular para la liberación controlada de metotrexato». Universidad Nacional Autónoma de México.
- Brattoli, Magda Gianluigi, Gianluigi De Gennaro, Valentina De Pinto, y Sara Lovascio. 2011. «Odour Detection Methods: Olfactometry and Chemical Sensors». *Sensors* 11: 5290-5322.
- Casale, John F. 1991. «A Chromatographic Impurity Signature Profile Analysis for Cocaine Using Capillary Gas Chromatography Illicit Fentanyl Signature Profiling View project». *Forensic Science* 36(5): 1312-30.
- Chiarotti, M, N Fucci, y C Furnari. 1991. «Comparative analysis of illicit heroin samples». *Forensic Science International* 50(1): 47-56.
- Comisión Nacional contra las Adicciones. 2004. *Encuesta Nacional de Adicciones ENA-2002*. México.
- Eiceman, Gary A., Zeev. Karpas, y Herbert H. Hill. 2016. *Ion mobility spectrometry*. tercera. ed. CRC Press.
- Environmental Protection Agency. 1999. *CATC TECHNICAL BULLETIN CHOOSING AN ADSORPTION SYSTEM FOR VOC: CARBON, ZEOLITE, OR POLYMERS? USA*.
- Exon, J. H. 2006. «A Review of the Toxicology of Acrylamide». *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 9(5): 397-412.

- Flores Martínez, Raúl. 2017. «Héroes caninos, al alza; sube producción». *Excelsior*. 2.
- Francesco, Fabio Di, Beatrice Lazzerini, Francesco Marcelloni, y Giovanni Pioggia. 2001. «An electronic nose for odour annoyance assessment». *Atmospheric Environment* 35(7): 1225-34.
- Furton, K. G. et al. 2002. «Identification of Odor Signature Chemicals in Cocaine Using Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography and Detector-Dog Response to Isolated Compounds Spiked on U.S. Paper Currency». *Journal of Chromatographic Science* 40(3): 147-55.
- Furton, Kenneth G, Norma Iris Caraballo, Michelle M Cerreta, y Howard K Holness. 2015. «Advances in the use of odour as forensic evidence through optimizing and standardizing instruments and canines.» *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370(1674).
- Garcia, Raquel, Maria João Cabrita, y Ana Maria Costa Freitas. 2011. «Application of Molecularly Imprinted Polymers for the Analysis of Pesticide Residues in Food—A Highly Selective and Innovative Approach». *American Journal of Analytical Chemistry* 02(08): 16-25.
- Gardner, Julian W., y Philip N. Bartlett. 1994. «A brief history of electronic noses». *Sensors and Actuators B: Chemical* 18(1-3): 210-11.
- Ghiasvand, Ali Reza, y Somayeh Hajipour. 2016. «Direct determination of acrylamide in potato chips by using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detection». *Talanta* 146: 417-22.
- Guć, Maria, y Grzegorz Schroeder. 2017. 5 World Journal of Research and Review *The Molecularly Imprinted Polymers. Influence of Monomers on The Properties of Polymers*.
- Haupt, Karsten, Anatoli Dzgoev, y Klaus Mosbach. 1998. «Assay System for the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Using a Molecularly Imprinted Polymer as an Artificial Recognition Element». *Anal. Chem* 70(3): 628-31.
- Hosoya, Haruo, Jiro Tanaka, y Saburo Nagakura. 1962. «Ultraviolet absorption spectra of monomer and dimer of benzoic acid». *Journal of Molecular Spectroscopy* 8(1-6): 257-75.
- Hudson, N., y G.A. Ayoko. 2008. «Odour sampling 1: Physical chemistry considerations». *Bioresource Technology* 99(10): 3982-92.
- Johnston, J M. 1999. *CANINE DETECTION CAPABILITIES: OPERATIONAL IMPLICATIONS OF RECENT R & D FINDINGS*.
- Karsten, Haupt, y Klaus Mosbach. 2000. «Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors». *Chemical Reviews* 100(7): 2495-2504.

- Kikuchi, Masashi, Naoto Tsuru, y Seimei Shiratori. 2006. «Recognition of terpenes using molecularly imprinted polymer coated quartz crystal microbalance in air phase». *Science and Technology of Advanced Materials* 7(2): 156-61.
- Kuhlman, Michael R., Rachel E. Gooding, Vladimir G. Kogan, y Curtis Bridges. 1997. «Particle size distribution of cocaine hydrochloride». En *Proceedings of the SPIE, Volume 2937, p. 251-257 (1997)*., eds. Pierre Pilon y Steve Burmeister. , 251-57.
- Lai, Hanh, Inge Corbin, y José R. Almirall. 2008. «Headspace sampling and detection of cocaine, MDMA, and marijuana via volatile markers in the presence of potential interferences by solid phase microextraction–ion mobility spectrometry (SPME-IMS)». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392(1-2): 105-13.
- Liang, Rongning, Lusi Chen, y Wei Qin. 2015. «Potentiometric detection of chemical vapors using molecularly imprinted polymers as receptors». *Scientific Reports* 5(1): 12462.
- Lorenzo, N, y KG Furton Hsu, YL. 2002. «Identification of canis familiaris active odor signature chemicals in methamphetamine and 3, 4-Methylenedioxy-N-Methylamphetamine (Ecstasy).» *CHEMICAL SOC: PhD Dissertation*, Florida International University.
- Lorenzo, Norma et al. 2003. «Laboratory and field experiments used to identify Canis lupus var. familiaris active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376(8): 1212-24.
- Luliński, Piotr. 2017. «Molecularly imprinted polymers based drug delivery devices: a way to application in modern pharmacotherapy. A review». *Materials Science and Engineering: C* 76: 1344-53.
- Macias, Michael S., Patricia Guerra-Diaz, José R. Almirall, y Kenneth G. Furton. 2010. «Detection of piperonal emitted from polymer controlled odor mimic permeation systems utilizing Canis familiaris and solid phase microextraction–ion mobility spectrometry». *Forensic Science International* 195(1-3): 132-38.
- Macias, Michael S. 2009. Training «The Development of an Optimized System of Narcotic and Explosive Contraband Mimics for Calibration and Training of Biological Detectors». Florida International University.
- Meischl, Florian et al. 2016. «Synthesis and evaluation of a novel molecularly imprinted polymer for the selective isolation of acetylsalicylic acid from aqueous solutions». *Journal of Environmental Chemical Engineering* 4(4): 4083-90.
- Mine Action Information Center at James Madison University., Ron et al. 1999. 9 *Journal of Conventional Weapons Destruction The journal of mine action*. Mine Action Information Center, James Madison University.
- Murray, George(columbia Md). 2003. «MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER BASED SENSORS FOR THE DETECTION OF NARCOTICS». : 10.

- Olof Ramström, *, † et al. 2001. «Food Analyses Using Molecularly Imprinted Polymers». *Journal for Agricultural and Food Chemistry* 49(5): 2015-2114.
- Otto, James, Michael F. Brown, y William Long. 2002. «Training rats to search and alert on contraband odors». *Applied Animal Behaviour Science* 77(3): 217-32.
- Pearce, T C. 1997. «Computational parallels between the biological olfactory pathway and its analogue “the electronic nose”: Part I. Biological olfaction.» *Bio Systems* 41(1): 43-67.
- Portari, Guilherme Vannucchi, Julio Sergio Marchini, y Alceu Afonso Jordão. 2008. «Validation of a Manual Headspace Gas Chromatography Method for Determining Volatile Compounds in Biological Fluids». *Laboratory Medicine* 39(1): 42-45.
- Quignon, Pascale et al. 2003. «Comparison of the canine and human olfactory receptor gene repertoires.» *Genome Biology* 4(12): R80.
- R Claus, H O Hoppen, y H Karg. 1981. «The secret of truffles: A steroidal pheromone?»». *Cellular and Microcellular life sciences* 9(2): 279-301.
- Rains, Glen Christopher, Jeffery K. Tomberlin, y Don Kulasiri. 2008. «Using insect sniffing devices for detection». *Trends in biotechnology* 26(6): 288-94.
- Restek Corporation. 2000. *A Technical Guide for Static Headspace Analysis, Using GC*.
- Rice, Somchai., y Jacek A. Koziel. 2015a. «The relationship between chemical concentration and odor activity value explains the inconsistency in making a comprehensive surrogate scent training tool representative of illicit drugs». *Forensic Science International* 257: 257-70.
- Rice, Somchai, y Jacek A. Koziel. 2015b. «Characterizing the Smell of Marijuana by Odor Impact of Volatile Compounds: An Application of Simultaneous Chemical and Sensory Analysis» ed. John I. Glendinning. *PLOS ONE* 10(12): 17.
- Rice, Somchai, y Jacek A Koziel. 2015c. «Odor impact of volatiles emitted from marijuana, cocaine, heroin and their surrogate scents.» *Data in brief* 5: 653-706.
- Rossiter, Karen J. 1996. «Structure–Odor Relationships».
- Shinohara, Sho et al. 2016. «Molecularly Imprinted Filtering Adsorbents for Odor Sensing.» *Sensors (Basel, Switzerland)* 16(11).
- Teglia, Carla M., Milagros Montemurro, María M. De Zan, y María S. Cámara. 2015. «Multiple responses optimization in the development of a headspace gas chromatography method for the determination of residual solvents in pharmaceuticals». *Journal of Pharmaceutical Analysis* 5(5): 296-306.

- Tipler, Andrew. 2013. «An Introduction to Headspace Sampling in Gas Chromatography : Fundamentals and Theory». *PerkinElmer, Inc.*: 3-33. http://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/GDE_Intro_to_Headspace.pdf.
- Vasapollo, Giuseppe et al. 2011. «Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective». *International Journal of Molecular Sciences* 12(9): 5908-45.
- W. Neuhaus, Uber die riechscharfe des hundes fur fettsauren, *Z. Vergl. Physiol.* 35 (1953) 527–552, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00350805>.