



Universidad
Zaragoza



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación de imidazol en nanoesponjas de ciclodextrina para nuevos envases activos

Development of analytical methods for imidazole quantification in cyclodextrin nanosponges for new active packaging

Autora:

Eva Clavero Elena

Directora:

Filomena Almeida e Silva

Grupo Universitario de Investigación Analítica (GUIA)

Departamento de Química Analítica

Grado en Biotecnología

Curso 2020/2021

INDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Nanoesponjas de ciclodextrina	3
2.1.1. Mecanismos de síntesis de las nanoesponjas de ciclodextrina	4
2.2. Papel de las ciclodextrinas en la industria alimentaria	6
2.2.1. Legislación referida a las ciclodextrinas	7
2.2.2. Legislación de los materiales en contacto con alimentos	7
2.3. Métodos de determinación de imidazol	8
2.3.1. Métodos de determinación de imidazol	8
2.3.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de modo mixto	9
2.3.2. Validación de métodos analíticos	10
2.3.2.1. Parámetros de la validación	10
3. OBJETIVOS	11
4. PARTE EXPERIMENTAL. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. Síntesis de las nanoesponjas	11
4.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	12
4.3. Validación	13
4.4. Determinación de la concentración de imidazol en el agua de los lavados	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
5.1. Desarrollo del método de HPLC-DAD	14
5.2. Validación del método	16
5.3. Selección del proceso de extracción/lavado de imidazol	18
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFÍA	24
8. ANEXOS	27
8.1. Anexo 1	27

1. RESUMEN

Las nanoesponjas de ciclodextrina (CD-NS) son polímeros entrecruzados formados por monómeros de ciclodextrina y agentes de entrecruzamiento como el carbonildiimidazol. Estos polímeros de ciclodextrina son insolubles en agua y disolventes orgánicos, no son tóxicos, son estables a temperaturas elevadas y presentan gran variedad de usos, como la eliminación de contaminantes en aguas residuales o aplicaciones en el campo farmacéutico.

En este trabajo, se ha desarrollado y validado un método de HPLC-DAD (cromatografía de alta resolución con detección por diodo) para aplicarlo a la cuantificación de imidazol como contaminante en el proceso de síntesis de las CD-NS para la incorporación de estas en nuevos envases activos. Así, se han podido evaluar distintos métodos de extracción de imidazol de las CD-NS.

La optimización y validación del método analítico ha incluido la determinación de la linealidad, precisión interdía, precisión intradía y precisión intermedia, además de los parámetros de coeficiente de variación, error relativo medio, límite de detección y de cuantificación. Para la extracción de imidazol, se han probado varias condiciones con agua a distintas temperaturas y velocidades de agitación, o en baño de ultrasonidos. La validación ha resultado exitosa puesto que, para todos los parámetros evaluados, los valores del coeficiente de variación y error relativo medio se han encontrado dentro de los límites de aceptabilidad; además de haber conseguido límites de detección (3,07 ppb) y cuantificación (0,1 ppm) muy bajos.

Finalmente, el método validado se ha aplicado a la cuantificación de imidazol en el proceso de síntesis de las CD-NS analizando el agua de los lavados. Se ha podido determinar que las mejores condiciones de lavado son en agitación a 600 rpm, a una temperatura de 40°C y en 4 ml de agua; ya que han sido las que han permitido una mayor extracción de imidazol.

ABSTRACT

Cyclodextrin nanospheres (CD-NS) are cross-linked polymers consisting of cyclodextrin monomers and cross-linking agents like carbonyldiimidazole. These cyclodextrin polymers are insoluble in water and organic solvents, are non-toxic, stable at high temperatures and they have a wide variety of uses, such as the removal of wastewater contaminants or applications in the pharmaceutical field.

In this project, an HPLC-DAD (high-resolution liquid chromatography with diode array detection) method has been developed and validated for further use in the quantification of imidazole as a contaminant from the CD-NS synthesis process to allow CD-NS incorporation into new packaging. In this way, different imidazole extraction methods from CD-NS have been evaluated.

The optimization and validation of the analytical method has included the determination of linearity, interday precision, intraday precision and intermediate precision. In addition, parameters such as the coefficient of variation, mean relative error or bias, limit of detection and limit of quantification have been also determined. For the imidazole extraction from CD-NS, several extraction conditions have been tested with water as extraction solvent at different

temperatures and stirring speeds, or in an ultrasonic bath. Method validation has been successful because the values of the coefficient of variation and mean relative error were within the limits of acceptability, for all the parameters evaluated. Furthermore, very low detection (3,07 ppb) and quantification (0,1 ppm) limits have been achieved.

Finally, the validated method has been applied to imidazole quantification during the extraction process from the CD-NS by analysing the extraction/washing water. It has been shown that the best CD-NS washing conditions, meaning the best imidazole extraction conditions, are with 4 ml of water at 40°C and 600 rpm as these were the conditions that allowed a greater imidazole extraction.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. NANOESPONJAS DE CICLODEXTRINA

Las nanoesponjas de ciclodextrina (CD-NS) son polímeros entrecruzados formados por monómeros de ciclodextrina y un agente de entrecruzamiento.

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos derivados de la degradación enzimática del almidón, compuestas por unidades de D(+)-glucopiranosas unidas por enlaces α -(1 \rightarrow 4) glucosídicos. Hay tres tipos de ciclodextrinas naturales que son α -, β - y γ -ciclodextrinas; y cuyas propiedades físico-químicas van a depender del número de unidades de D(+)-glucopiranosas que contengan (tabla 1) (1).

Propiedades	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de D(+)-glucopiranosas	6	7	8
Masa molar (g/mol)	973	1135	1297
Diámetro de la cavidad (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Temperatura de descomposición (°C)	250-260	255-265	240-245
Solubilidad en H ₂ O (g /100 cc a 25 °C)	14.5	1.85	23.2
Poder rotatorio de la luz polarizada [α] _D 25°C	150	162.5	177.4
Profundidad de la cavidad (Å)	7.9	7.9	7.9
Diámetro de la periferia (Å)	14.6	15.4	17.5
Volumen aproximado de la cavidad (Å ³)	174	262	972

Tabla 1. Características y propiedades físico-químicas de las α -, β - y γ -CDs. Fuente: (1).

Las ciclodextrinas son sólidos cristalinos incoloros, solubles en agua y en disolventes polares apróticos, y prácticamente insolubles en la mayoría de los disolventes orgánicos. En su estructura (figura 1) dejan una cavidad interna de carácter hidrofóbico y apolar, por lo que son capaces de formar complejos de inclusión con distintos tipos de moléculas que se alojan en su interior.

Además, los grupos reactivos (grupos hidroxilo) de las ciclodextrinas les permiten actuar como monómeros multifuncionales ya que son capaces de entrecruzarse con una amplia variedad de productos químicos, lo que permite la formación de polímeros de ciclodextrina denominados nanoesponjas de ciclodextrina (1,2).

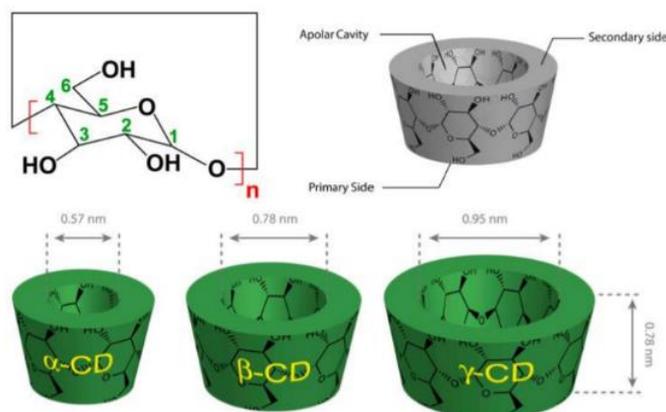


Figura 1. Esquema estructural y dimensiones de las α - ($n=6$), β - ($n=7$) y γ -CDs ($n=8$). Fuente: (1).

Las nanoesponjas de ciclodextrina son insolubles en agua y en disolventes orgánicos, no se hinchan (a diferencia de otros tipos de nanoesponjas), no son tóxicas y son estables hasta temperaturas muy elevadas como 300°C. Han presentado resultados prometedores en una gran variedad de aplicaciones ya sea eliminar compuestos orgánicos de las aguas residuales (por lo que se podrían utilizar para purificar agua contaminada) y en aplicaciones en el campo farmacéutico para encapsular y transportar fármacos, pues son biocompatibles y no tóxicas (2,3).

2.1.1. MECANISMOS DE SÍNTESIS DE LAS NANOESPONJAS DE CICLODEXTRINA

La ruta convencional de síntesis de las nanoesponjas de ciclodextrina consiste en disolver el monómero de ciclodextrina junto con un agente de entrecruzamiento apropiado en un disolvente polar aprótico orgánico, como N,N-dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfóxido (DMSO). Como agentes de entrecruzamiento se suelen utilizar compuestos bifuncionales de carbonilo activo como el 1,1-carbonildiimidazol (CDI) o el carbonato de difenilo.

Las propiedades finales de la nanoesponja, como el tamaño y la polaridad, se pueden modificar variando tanto el grado como el agente de entrecruzamiento (2,3). Se puede apreciar el esquema de la síntesis de las nanoesponjas de ciclodextrina en las figuras 2 y 3.

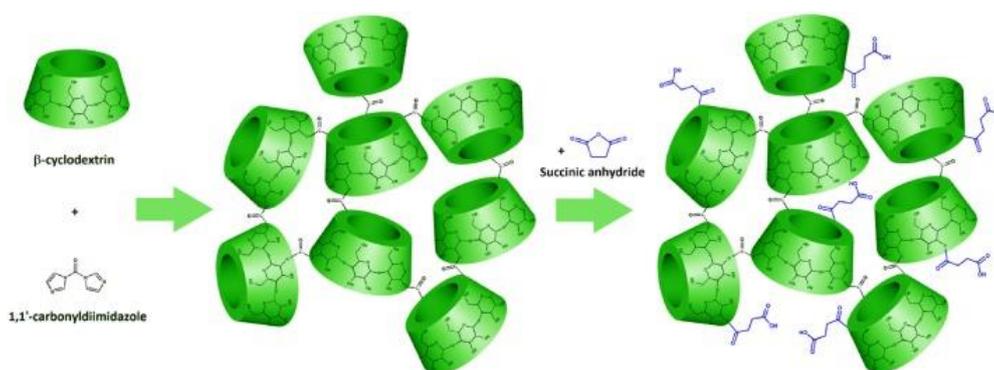


Figura 2. Esquema de la síntesis de las nanoesponjas de β -ciclodextrina, utilizando el 1,1-carbonildiimidazol (CDI) como agente de entrecruzamiento. Fuente: (4).

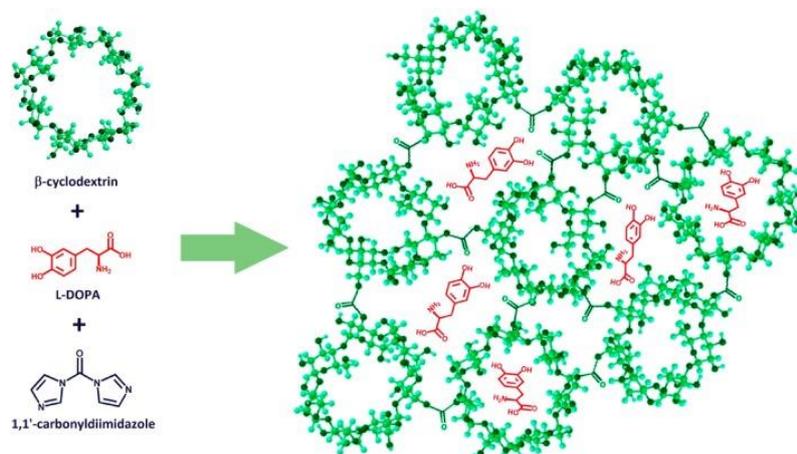


Figura 3. Nanoesponja de β -ciclodextrina utilizando el 1,1-carbonildiimidazol (CDI) como agente de entrecruzamiento. Se aprecia la capacidad de la nanoesponja para encapsular y transportar fármacos como por ejemplo la L-DOPA. Fuente: (4).

Cabe destacar que el uso de disolventes como DMF o DMSO puede afectar al resultado final de las nanoesponjas por tratarse de compuestos tóxicos, lo que puede tener inconvenientes en posibles aplicaciones biomédicas futuras. Además, son disolventes costosos y difíciles de reciclar debido a sus altos puntos de ebullición. Por ello, una vez que se han sintetizado las CD-NS se requiere un proceso de purificación utilizando una gran cantidad de agua o disolventes volátiles para eliminar el exceso de DMF o DMSO dentro de la estructura de la nanoesponja, lo que resulta un impedimento (2,3).

Como consecuencia, actualmente se está llevando a cabo una nueva vía de síntesis de nanoesponjas de ciclodextrina, conocida como síntesis verde, mediante un método mecánico-químico denominado alienación mecánica. La mecano-química se basa en la aplicación de fuerzas mecánicas (como compresión, cizallamiento o fricción) para conducir y controlar las reacciones químicas, ya que se va a permitir la transferencia de energía a los enlaces químicos (5). Este enfoque está en auge ya que las síntesis mecano-químicas son fácilmente aplicables a escala industrial, son seguras y eficientes, además de que reducen el excesivo gasto de energía y evitan el uso de disolventes tóxicos comentado anteriormente (2).

Estos procesos de alienación mecánica se pueden llevar a cabo en molinos de bolas planetarios (ver anexo 1, figura A1) donde se pueden realizar procesos de trituración y mezcla, homogeneización y aleaciones mecánicas, entre otros. En estos molinos, el recipiente de molienda (ver anexo 1, figura A2) cuenta con un dispositivo de cierre de seguridad (ver anexo 1, figuras A3 y A4) y se encuentra colocado de forma excéntrica sobre la rueda principal, ambos girando en sentidos contrarios (6).

Los procesos que tienen lugar dentro de los molinos de bolas planetarios dependen del material procesado y de la síntesis, por lo que las condiciones óptimas de molienda deben evaluarse para cada sistema individual. Por ello, es necesario tener en cuenta diferentes parámetros como las propiedades de las bolas de molienda, la relación de llenado del recipiente y la velocidad de revolución del molino (7).

Mediante este método de molienda de bolas se va a generar una diferencia de velocidad entre el recipiente y las bolas de circonio contenidas en el mismo (figura 4), generando fuerzas mecánicas de impacto y fricción que van a liberar gran cantidad de energía que se va a transferir a los enlaces químicos (5).

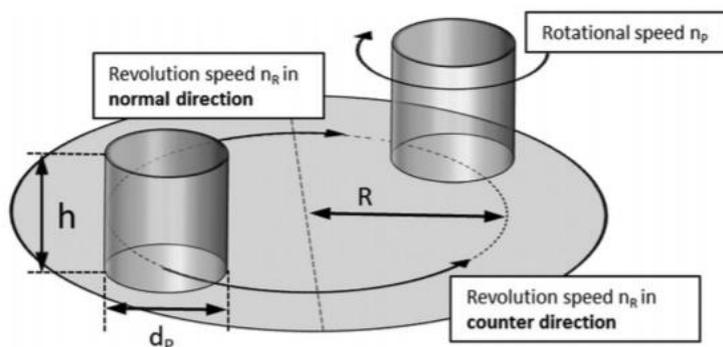


Figura 4. Esquema del funcionamiento del molino de bolas planetario. Fuente: (7).

Para llevar a cabo la síntesis de las nanoesponjas de ciclodextrina, dentro del molino se van a incluir el monómero de ciclodextrina junto con el agente de entrecruzamiento, y las condiciones de molienda/síntesis se van a optimizar para que el rendimiento de la reacción sea lo más cercano posible al 100%.

En el caso del agente de entrecruzamiento CDI, este debe reaccionar totalmente con los grupos reactivos de la CD y formar así un enlace carbonilo (C=O) entre dos monómeros de CD. Como consecuencia de esta reacción, se van a liberar dos moléculas de imidazol reactivo que se queda retenido dentro de la estructura de la nanoesponja y que debe ser eliminado, preferentemente sin el uso de disolventes orgánicos, debido a cuestiones medioambientales (2).

Teniendo en cuenta que el imidazol es soluble en agua y que el CDI en exceso también sufre hidrólisis, el agua parece ser un disolvente de extracción muy adecuado para la eliminación de estos dos contaminantes de las CD-NS (2), como se puede observar en la figura 5.

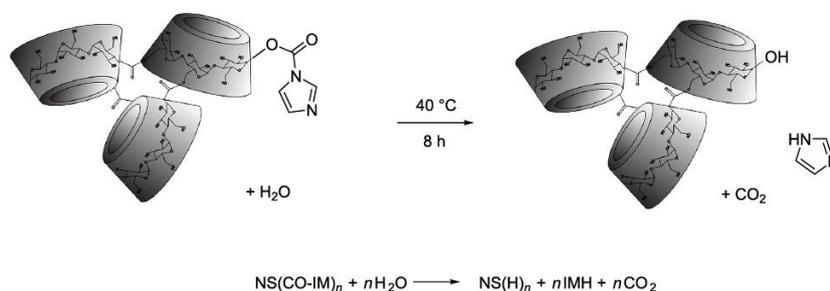


Figura 5. Esquema de la realización de los lavados de la nanoesponja de ciclodextrina. Fuente: (2).

2.2. PAPEL DE LAS CICLODEXTRINAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

De todas las ciclodextrinas producidas, alrededor del 80-90% se emplean en la industria alimentaria para solubilizar colorantes alimenticios y vitaminas, estabilizar aromas y sabores, y eliminar propiedades organolépticas no deseadas y contaminaciones microbiológicas, entre otros (8,9).

Una aplicación muy interesante de las ciclodextrinas en la industria alimentaria son los materiales activos para el envasado de alimentos. Gracias a ellos, se van a reducir los residuos orgánicos volátiles contaminantes y se van a mejorar las propiedades de barrera del envase (como la tasa de difusión y la tasa de transmisión), permitiendo mantener la calidad y seguridad de los alimentos. Cabe destacar también que las ciclodextrinas pueden actuar como sistemas de administración de antimicrobianos y antioxidantes, que una vez liberados van a proteger el producto contra el crecimiento microbiano (8).

Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la incorporación de las nanoesponjas de ciclodextrina a los materiales de envase de alimentos.

2.2.1. LEGISLACIÓN REFERIDA A LAS CICLODEXTRINAS

La regulación del uso de las α -, β -, y γ -ciclodextrinas es diferente según el país, siendo en Europa consideradas como ingredientes alimentarios. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y del Comité en Aditivos Alimentarios (JECFA) recomiendan 5 mg/kg/día como ingesta máxima de β -CDs en los alimentos, mientras que para las α - y γ -CDs no hay definida una ingesta diaria aceptable (10).

- 2008/413/EC autoriza las α -ciclodextrinas como nuevo alimento, y la designación deberá aparecer en la lista de ingredientes de los productos alimentarios que la contengan.
- 2012/288/UE autoriza las γ -ciclodextrinas como nuevo ingrediente alimentario, y la designación deberá aparecer en la lista de ingredientes de los productos alimentarios que la contengan (10).
- La β -ciclodextrina es un aditivo alimentario con el número E459 (11).

2.2.2. LEGISLACIÓN DE LOS MATERIALES EN CONTACTO CON ALIMENTOS

Se debe tener en cuenta que el material va a estar destinado al contacto con los alimentos y que va a considerarse un material activo, ya que se van a incluir sustancias que le van a dotar de una funcionalidad, en este caso las nanoesponjas de ciclodextrina (12).

Consideraciones legales para los materiales en contacto con alimentos

En relación a los materiales destinados a entrar en contacto con los alimentos, se recoge en el artículo 3 del Reglamento Marco (CE) 1935/2004 que estos deben ser inertes para evitar la transmisión de sustancias a los alimentos en cantidades que puedan suponer un peligro para la salud humana y que puedan provocar una modificación significativa de la composición del producto alimenticio y de sus características organolépticas (buenas prácticas de fabricación). Este reglamento también incluye otros aspectos como la inspección y medidas de control, etiquetado, trazabilidad, declaración de conformidad, entre otros (12).

Consideraciones legales para los materiales activos

Respecto a los materiales activos, el reglamento específico que se aplica es el artículo 4 del Reglamento CE 450/2009 que establece que las sustancias responsables de la función activa o inteligente del material deben ser previamente evaluadas para poder garantizar su seguridad, y cumplir los requisitos del Reglamento Marco (CE) 1935/2004 anteriormente mencionado. Los requisitos son estar fabricados según las buenas prácticas de fabricación, y que su etiquetado, publicidad y presentación no induzcan a error en los consumidores (12).

Las solicitudes de autorización de sustancias constituyentes de los envases activos, en el caso de que todavía no estén aprobadas, se tienen que presentar ante la autoridad competente del país junto con un expediente técnico que contenga la información que se indica en la guía para la evaluación de su seguridad preparada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (12). Las legislaciones aplicables a los materiales en contacto con alimentos y a los envases activos se pueden observar a continuación en la figura 6.

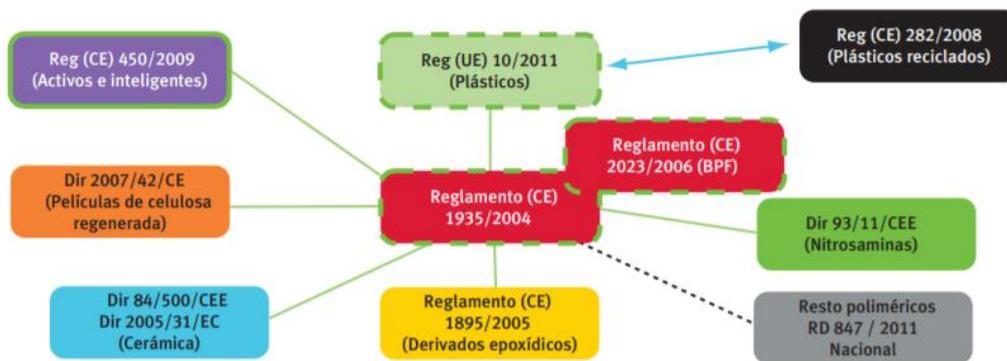


Figura 6. Legislaciones aplicables a los materiales en contacto con alimentos y a los envases activos. Fuente: (12).

2.3. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE IMIDAZOL

El imidazol ($C_3H_4N_2$) tiene una masa molecular de 68,1 g/mol y un pKa de 7,1. Se trata de un compuesto orgánico de estructura cristalina, color blanco o incoloro, con elevada solubilidad en disolventes polares (solubilidad en agua a 20°C de 663 g/L) y baja en disolventes apolares, y con carácter anfipático. La estructura del imidazol se puede observar en la figura 7.

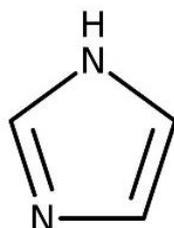


Figura 7. Estructura del imidazol.

Respecto a la toxicidad, el imidazol inhalado puede causar tos o dolores de garganta ya que irrita el tracto respiratorio, además de ser una sustancia corrosiva para la piel y que irrita gravemente los ojos. Se trata de un compuesto contaminante y tóxico, y por ello debe ser eliminado de los envases activos (13,14).

2.3.1. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE IMIDAZOL

Para la determinación de imidazol se pueden llevar a cabo varios métodos, entre los que destacan las técnicas cromatográficas como las cromatografías líquidas de alta resolución (HPLC) y de ultra alta resolución (UPLC) de modo mixto, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la cromatografía de gas-líquido (GLC) o la cromatografía líquida de columna monolítica de alto rendimiento (MC-HPLC), entre otros (15).

2.3.1.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE MODO MIXTO

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una forma específica de cromatografía en columna y una herramienta esencial en los laboratorios analíticos para separar, identificar y cuantificar una amplia gama de productos químicos y biomoléculas.

Principalmente se basa en una columna que contiene la fase estacionaria en su interior, una bomba que mueve la fase móvil (el solvente) a través de la columna y un detector. La separación viene dada por la capacidad que tienen los componentes de la muestra para distribuirse entre la fase estacionaria y la fase móvil. La muestra a analizar se introduce en un pequeño volumen a la corriente de la fase móvil y es retenida por interacciones químicas o físicas específicas con la fase estacionaria, dependiendo de la naturaleza del analito y la composición de ambas fases (16,17).

En la cromatografía líquida, para poder llevar a cabo la separación de los compuestos polares, no polares e iónicos en un solo análisis, se utilizan columnas de modo mixto. La cromatografía de modo mixto es un método que tiene principalmente propiedades de fase reversa pero combinada con interacciones de intercambio iónico (catiónico o aniónico) (18,19).

Para ello, cuentan con una larga cadena de grupos alquilo para la fase reversa, y un grupo de intercambio aniónico/catiónico en el extremo de la misma para la funcionalidad de intercambio iónico (figura 8) (20).

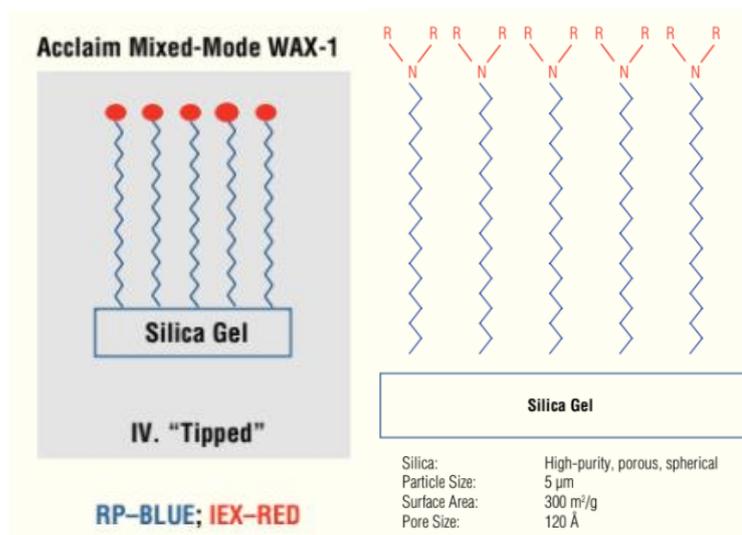


Figura 8. Representación de columnas de modo mixto. En azul se muestra la cadena de grupos alquilo para la retención de la fase reversa, y en rojo se muestra el grupo de intercambio iónico. Fuente: (20).

Los tiempos de retención de los analitos en estas columnas de modo mixto se pueden ver modificados al cambiar el contenido de disolventes orgánicos, el pH y la fuerza iónica (20). El pH de la fase móvil es una de las variables más importantes que se debe controlar en el proceso de separación si las muestras a analizar contienen compuestos ionizables (grupos funcionales ácidos o básicos). Si el pH se ve modificado, puede cambiar la ionización de estos analitos y con ello su capacidad de unirse al grupo de intercambio iónico. Por ello, estas columnas funcionan con una fase móvil que contiene una disolución tampón (21).

Para una correcta cromatografía, el pH de la fase móvil debe estar al menos 2 unidades de pH alejado del pKa de la muestra. Por el contrario, si se encuentra cerca del pKa del compuesto a analizar, pequeños cambios en el pH pueden producir grandes cambios en la retención, cosa que no es deseable. Además, algunos compuestos son extremadamente sensibles a cambios muy pequeños en el pH) (21).

2.3.2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es un proceso por el que se establece que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado. El objetivo de una validación es demostrar que el método es apto para el propósito indicado (22).

2.3.2.1. PARAMÉTROS DE LA VALIDACIÓN

Los parámetros que permiten validar un método analítico son la precisión, exactitud, selectividad, reproducibilidad y estabilidad del analito (22,23).

La **precisión** es la capacidad que tiene un instrumento, en este caso el HPLC, de dar el mismo resultado en mediciones diferentes que son realizadas repetidamente en las mismas condiciones.

Dentro de este parámetro, la precisión intradía es la precisión que se obtiene en un mismo día, la precisión interdía es la precisión que se obtiene en días diferentes y la precisión intermedia es la capacidad de ser preciso en unos valores que son diferentes a los patrones estándar utilizados, pero que se encuentran dentro de la recta de calibrado. Esto se resume en el coeficiente de variación, que viene dado por la siguiente expresión:

$$\text{Coef. variación (CV)} = \frac{\text{desviación estandar}}{\text{media}} \cdot 100 (\%)$$

La **exactitud** es la capacidad que tiene un instrumento de acercarse al valor de la magnitud real. Esto se resume en el error relativo o bias, que viene dado por la siguiente expresión:

$$\text{error relativo (bias)} = \frac{\text{valor teórico} - \text{valor obtenido}}{\text{valor teórico}} \cdot 100 (\%)$$

La **selectividad** es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito de interés en presencia de otros componentes en la muestra. Si el método está destinado a cuantificar más de un analito, cada uno de ellos debe probarse para asegurarse de que no haya interferencia.

La **reproducibilidad** representa la precisión que tiene un método analítico en las mismas condiciones de funcionamiento durante un breve periodo de tiempo. También representa la precisión que tiene un método analítico al ser realizado en laboratorios diferentes.

La **estabilidad** del analito depende de sus propiedades químicas, las condiciones de almacenamiento y sistema que lo contiene y la matriz usada. Se debe evaluar el proceso y tiempo de almacenamiento: estabilidad en la congelación y descongelación, a corto y largo plazo, estabilidad cuando el analito este contenido en la matriz, entre otros (22,23).

Una **recta de calibrado** es la relación existente entre la respuesta del método y la concentración de analito. Se debe realizar para cada uno de los analitos presentes en la muestra y se deben utilizar un número suficiente de estándares para definir adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, por lo que debe constar de un blanco (muestra sin analito) y un mínimo de 6 puntos estándar distintos de cero. Se debe cubrir el rango completo de concentraciones esperadas, incluido el límite de cuantificación (LOQ), que es la concentración más baja de la recta de calibrado (22).

El **límite de cuantificación (LOQ)** es la concentración más baja de la recta patrón que se puede medir con una exactitud y precisión confiables. El estándar más bajo de la recta de calibrado se puede aceptar como límite de cuantificación si la respuesta del analito es al menos 5 veces la respuesta del blanco, y el pico debe ser identificable y reproducible (22).

El **límite de detección (LOD)** es la cantidad o concentración mínima de compuesto que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. (24) Se calcula con la disolución de menor concentración que se ha utilizado, en este caso concreto con una disolución de 10 ppb (0,01 ppm). Se calcula teniendo en cuenta la altura que presenta la muestra en el cromatograma (h_c), la altura del blanco al mismo tiempo de retención (h_b) y la altura del ruido (h_r) (25).

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar y validar un método de HPLC-DAD para la determinación del contaminante imidazol en nanoesponjas de ciclodextrina.

Para alcanzar este objetivo principal, se han definido tres objetivos específicos:

- Sintetizar nanoesponjas de ciclodextrina.
- Desarrollar y validar un método de HPLC-DAD para cuantificar imidazol en nanoesponjas de ciclodextrina para nuevos envases activos.
- Aplicar el método validado a la determinación de imidazol en el proceso de síntesis de las nanoesponjas de ciclodextrina.

4. PARTE EXPERIMENTAL. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. SÍNTESIS DE LAS NANOESPONJAS

Para la síntesis de las nanoesponjas de ciclodextrina se introducen el monómero de α -CD y el CDI en las proporciones adecuadas (un ratio 1:4 de α -CD:CDI, lo que corresponde aproximadamente a 3,38 g de α -CD y 2,25 g de CDI) dentro de una jarra de óxido de circonio de 50 ml. Dentro de la jarra también se incluyen 10 bolas de óxido de circonio de 10 mm. Previamente, las α -CD se han dejado secar en la estufa a 100°C para eliminar la humedad hasta tener un peso estable, puesto que la presencia de moléculas de agua adsorbidas a las CDs tiene un efecto muy dañino en el rendimiento de la síntesis.

La jarra con todo el contenido se pesa y se coloca en el molino PM100 bien ajustada y con el peso equilibrado. Se establece un programa de duración de 3 horas a una velocidad de 600 rpm, y cada 15 minutos se invierte el sentido de giro del molino. Pasado este tiempo, se procede al lavado de las nanoesponjas.

Para ello, el sólido sintetizado es retirado del interior de la jarra con agua miliQ, disolviendo así el CDI que queda restante, y se procede a la filtración por vacío de la suspensión resultante de CD-NS/agua utilizando un filtro de nylon de 0,2 μm y registrando el volumen del filtrado. A continuación, se vuelve a lavar con agua a 40°C durante 2 horas en agitación magnética, se filtra de nuevo y se guarda el agua de lavado para el posterior análisis de imidazol.

Este proceso de lavado se repetirá las veces necesarias hasta que el imidazol esté presente en la muestra en una concentración igual o inferior a 0,01% (masa imidazol/masa CD-NS).

4.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El análisis por HPLC-DAD se lleva a cabo con el modelo Waters 2695 Separations Module (figura 9) acoplado a un detector DAD Waters 2996 Photodiode Array Detector (figura 10) (15). Para controlar el equipo y analizar los resultados obtenidos mediante el HPLC-DAD, se utiliza el software Empower.



Figura 9. HPLC-DAD modelo Waters 2695 Separations Moduley.



Figura 10. Detector DAD Waters 2996 Photodiode Array Detector.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Acquity Waters UPLC BEH HILIC (figura 11), cuyas dimensiones son 2,1 mm x 100 mm y el tamaño de partícula de 1,7 μm (26), utilizando una disolución de 80:20 de acetonitrilo (ACN):5 mM dihidrogenofosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) (pH=3,80), previamente filtrada y sonicada (para eliminar las impurezas) como fase móvil.

La columna se ha mantenido a una temperatura de 35°C durante el proceso de separación y el flujo utilizado ha sido de 0,4 ml/min. Estas condiciones se han utilizado para determinar imidazol en un volumen de inyección de 10 μl .



Figura 11. Columna Acquity Waters UPLC BEH HILIC.

4.3. VALIDACIÓN

El método ha sido validado siguiendo las directrices de la ICH (27). Para ello, durante un periodo de 5 días se ha analizado:

- **Linealidad.** Para evaluar la linealidad del método, se prepara cada día de la validación una recta de calibrado de 8 puntos (22,23,27).
- **Precisión interdía.** Para la precisión interdía se evalúa la cuantificación de los 8 puntos de la recta de calibrado a lo largo de 5 días. Para cada concentración se indica la media y desviación estándar, el CV y el error relativo medio (22,23,27).
- **Precisión intradía.** Para la precisión intradía se evalúa la cuantificación de cuatro concentraciones equidistantes de la recta de calibrado por quintuplicado y en un solo día de la validación. Para cada concentración se indica la media y desviación estándar, el CV y error relativo medio (22,23,27).
- **Precisión intermedia.** Para analizar la precisión intermedia, se evalúa la cuantificación de concentraciones que no se encuentran presentes en la recta de calibrado por triplicado en cada uno de los 5 días del proceso de validación (n=15). Para cada concentración se indica la media y desviación estándar, el CV y error relativo medio (22,23,27).

Las disoluciones patrón para realizar la recta de calibrado se preparan por gravimetría pesando en la balanza, y es muy importante que se homogenicen bien en el vórtex para que todo el imidazol quede bien disuelto.

Se parte de una disolución de imidazol de 10.000 ppm en agua, y a partir de ella se realizarán el resto de disoluciones estándar en un rango de concentraciones de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 y 10 ppm en fase móvil. Para ello, a partir de la disolución de 10.000 ppm se prepara una disolución intermedia de 100 ppm, de la que se obtiene a continuación la de 10 ppm; y a partir de esta última se prepara el resto.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IMIDAZOL EN EL AGUA DE LOS LAVADOS

Se va a determinar la concentración de imidazol presente en el agua de los lavados realizados durante el proceso de síntesis de las nanoesponjas de ciclodextrina. Para ello, se realizan diluciones 1:100 tomando 10 µl del agua del lavado y 990 µl de fase móvil, para así tener una composición de muestra semejante a la de la fase móvil sin la necesidad de evaporar la muestra y reconstituir en la fase móvil. Este mililitro lo llevamos a un vial de HPLC para su posterior análisis. El bajo límite de detección de nuestro método cromatográfico nos permite hacerlo de esta forma.

Para obtener las muestras del agua de lavado se han ensayado diferentes condiciones utilizando el sistema de ultrasonidos, tomando volúmenes de 2 y 4 ml de agua y sacando alícuotas diferentes tiempos (2, 4, 6 y 8 horas).

Por otra parte, también se han probado distintas condiciones utilizando un baño con temperatura y agitación. Se han valorado los parámetros de velocidad de agitación, temperatura, volumen y tiempo. Como se puede ver en la tabla 2, en cada una de ellas se evalúa un volumen de agua de 2 y 4 ml, y se van tomando alícuotas a los mismos tiempos (2, 4, 6 y 8 horas).

Tabla 2. Condiciones en las que se han ensayado las muestras del agua de lavado, valorando los parámetros de velocidad de agitación, temperatura, volumen de agua y tiempo.

Velocidad de agitación (rpm)	Temperatura (°C)	Volumen agua (ml)	Tiempo (h)
600	40	2 y 4	2, 4, 6 y 8
600	70	2 y 4	2, 4, 6 y 8
1000	40	2 y 4	2, 4, 6 y 8

Para ello, se pesan 0,14 g de nanoesponja de ciclodextrina y se resuspenden en 10 ml de agua miliQ utilizando el vórtex, para a continuación centrifugarlo a 4350 rpm durante 5 minutos, retirando una alícuota de 1 ml del sobrenadante obtenido para su posterior análisis. Esta muestra se considerará como el agua de lavado al inicio (a tiempo 0). Se retira el sobrenadante restante y se resuspende el pellet de CD-NS en 2 o 4 ml, según las condiciones descritas en la tabla 2.

A cada tiempo de lavado en análisis, se repite el proceso de centrifugación y resuspensión, procediendo así a un reemplazamiento de todo el volumen de lavado en cada una de las condiciones de evaluación. Se retiran alícuotas de cada sobrenadante obtenido después de cada centrifugación para la determinación de imidazol como ya se ha descrito para el tiempo 0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. DESARROLLO DEL MÉTODO DE HPLC-DAD

Para llevar a cabo el desarrollo del método de HPLC-DAD es necesaria una optimización del mismo, teniendo en cuenta diferentes condiciones del método cromatográfico como son el tampón, la temperatura de la columna y de las muestras a analizar, el volumen y tiempo de inyección y el flujo de la columna, entre otras.

Respecto a la elección del tampón para preparar la fase móvil, el imidazol presenta un máximo de absorbancia en el espectro ultravioleta visible (UV-VIS) a una longitud de onda de 215 nm (15). Probamos con dos compuestos: el formiato de amonio y el dihidrogenofosfato de amonio.

El formiato de amonio presenta a 215 nm una absorbancia aproximadamente de 1,5 unidades de absorbancia (UA), mientras que la que presenta el dihidrogenofosfato de amonio es mucho más baja, como se puede observar en la figura 12. El tampón que vayamos a utilizar no debe presentar altas absorbancias a esa longitud de onda, ya que de ese modo no se podría cuantificar nuestro compuesto de interés, como se aprecia en la figura 13. Por ello, descartamos el formiato de amonio para usarlo como buffer y seleccionamos el dihidrogenofosfato de amonio.

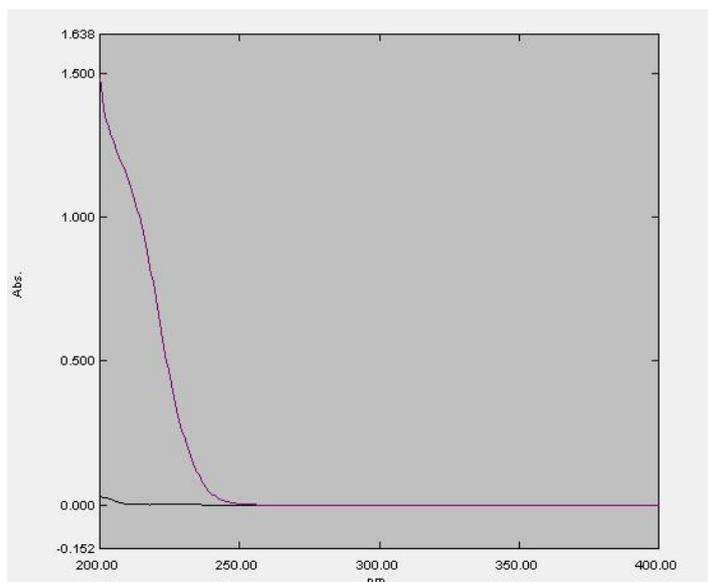


Figura 12. En el eje de abscisas se representa la longitud de onda y en el eje de ordenadas la absorbancia. Se muestra una comparación de los espectros en el UV-VIS del formiato de amonio (color morado) y de dihidrogenofosfato de amonio (color negro).

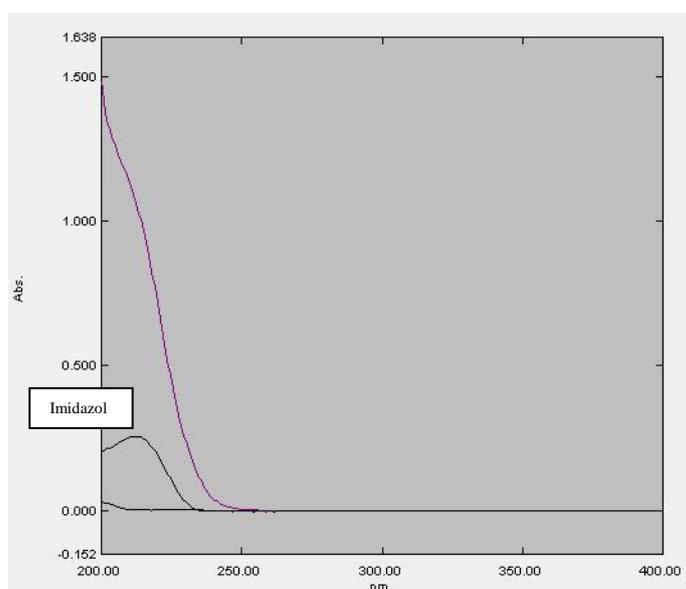


Figura 13. Comparación de los espectros en el UV-VIS de los dos buffers: formiato de amonio (color morado) y dihidrogenofosfato de amonio (color negro), junto con el imidazol (color negro etiquetado).

5.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Como ya se ha mencionado anteriormente, se han estudiado los términos de linealidad, precisión intermedia, precisión intradía y precisión interdía siguiendo un protocolo de validación de 5 días. Se adoptó un método de regresiones de mínimos cuadrados ponderados de $1/x$ para disminuir el error del método y así mejorar la calidad del método analítico (28). Para analizar estos parámetros, se necesita conocer el área del pico correspondiente al imidazol. El cromatograma del HPLC-DAD a una longitud de onda de 215 nm muestra que el pico de imidazol aparece a un tiempo de retención alrededor de 1,5 minutos (figura 14).

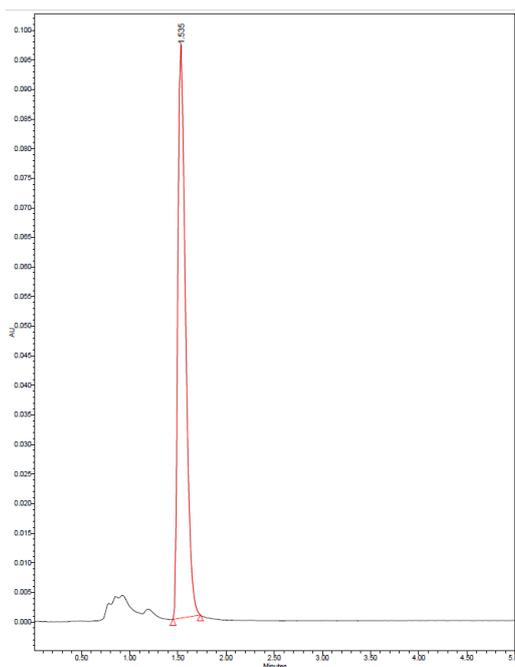


Figura 14. Se muestra el cromatograma del imidazol, donde se ha seleccionado el área del pico correspondiente a este compuesto cuyo tiempo de retención son 1,535 minutos. El eje de abscisas representa el tiempo (minutos) y el eje de ordenadas la absorbancia (UA).

Respecto a la linealidad, tras todo el proceso de validación se obtienen cinco rectas de calibrado (una por cada día) de las que se determina el promedio y desviación estándar de la pendiente, ordenada en el origen y valor del coeficiente de correlación (R^2), como se puede apreciar en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de media \pm desviación estándar correspondientes a la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación (R^2) de las cinco rectas de calibrado realizadas para determinar la linealidad.

Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación (R^2)
$54545,60 \pm 1303,41$	$1394,12 \pm 987,53$	$0,9996 \pm 0,0003$

Respecto a la precisión intermedia, los resultados muestran que el CV obtenido es inferior al 3% en todas las concentraciones estudiadas, siendo el menor valor 1,55%, como se puede observar en la tabla 4.

En relación al error relativo, el máximo valor que se puede aceptar es de 20% en la concentración más baja ensayada (en este caso 0,1 ppm), y de 15% en el resto de las concentraciones. Los valores negativos del error relativo indican que se ha producido una subestimación en la cuantificación, es decir, que el método determina concentraciones por debajo de las teóricas. En este caso, el error relativo medio máximo que se alcanza es de 1,12%, por lo que se encuentra dentro del intervalo de aceptabilidad (tabla 4).

Tabla 4. Valores de media \pm desviación estándar, coeficiente de variación (CV) y error relativo medio para las concentraciones de 2, 4 y 6 ppm. Corresponden a los datos de precisión intermedia.

Concentración (ppm)	Media (ppm)	CV (%)	Error relativo medio (%)
2	2,0801 \pm 0,0548	2,64	-0,10
4	4,0512 \pm 0,0986	2,43	0,61
6	6,0718 \pm 0,0938	1,55	1,12

Respecto a la precisión intradía, como se puede observar en la tabla 5, los CV obtenidos fueron inferiores a 4% en todas las concentraciones ensayadas. El error relativo medio es inferior a 10% en todos los casos, por lo que también se encuentra dentro del intervalo que se puede aceptar.

Tabla 5. Valores de media \pm desviación estándar, coeficiente de variación (CV) y error relativo medio para las concentraciones de 0,1; 1; 5 y 10 ppm. Corresponden a los datos de precisión intradía.

Concentración (ppm)	Media (ppm)	CV (%)	Error relativo medio (%)
0,1	0,1155 \pm 0,0038	3,25	9,35
1	1,0016 \pm 0,0159	1,58	-0,93
5	5,2981 \pm 0,1354	2,55	4,92
10	1,7187 \pm 0,2876	2,68	6,16

Respecto a la precisión interdía, los CV fueron inferiores al 6% en todas las concentraciones, siendo el más alto el de la concentración de 0,1 ppm. El error relativo medio tiene el máximo valor a una concentración de 0,25 ppm, aunque igualmente se encuentra dentro del intervalo de aceptabilidad. Para el resto de concentraciones ensayadas es menor del 6%, lo cual también es aceptable. Estos resultados se pueden observar en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de media \pm desviación estándar, coeficiente de variación (CV) y error relativo medio para las concentraciones de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 y 10 ppm. Corresponden a los datos de precisión interdía.

Concentración (ppm)	Media (ppm)	CV (%)	Error relativo medio (%)
0,1	0,1116 \pm 0,0063	5,64	5,95
0,25	0,2319 \pm 0,0095	4,12	8,38
0,5	0,5387 \pm 0,0103	1,91	3,64
1	0,9776 \pm 0,0268	2,74	-3,46
2,5	2,5025 \pm 0,0254	1,02	-0,49
5	5,0751 \pm 0,0651	1,28	0,79
7,5	7,5458 \pm 0,0752	0,10	0,25
10	10,0274 \pm 0,1106	1,10	-0,24

Durante la validación, también se analizaron muestras de concentraciones 10 ppb, 25 ppb y 50 ppb. Debido a que el límite de detección (LOD) se calcula con la disolución de menor concentración ensayada, en este caso se utilizó la de 10 ppb. Teniendo en cuenta la altura que presenta la muestra en el cromatograma (h_c), la altura del blanco al mismo tiempo de retención (h_b) y la altura del ruido (h_r) (25), el límite de detección obtenido es 3,07 ppb. El límite de cuantificación (LOQ) corresponde al valor mínimo de la recta de calibrado, en este caso 0,1 ppm. Estos resultados se pueden apreciar a continuación en la tabla 7.

Tabla 7. Valores del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ).

Límite de detección (LOD)	Límite de cuantificación (LOQ)
3,07 ppb	0,1 ppm

Se puede hacer una comparación en términos del límite de detección y de cuantificación entre este método desarrollado y otros métodos de HPLC-DAD para cuantificar imidazol que se encuentran presentes en la literatura.

Se puede observar que el límite de cuantificación obtenido en nuestro método es 0,1 ppm (0,1 $\mu\text{g/ml}$), mientras que otros métodos similares encontrados presentan un valor del límite de cuantificación de 7,70 ppm (29) y de 6,25 ppm (30). Se puede decir entonces que nuestro método puede medir con exactitud y precisión confiables concentraciones más bajas de una recta patrón, en comparación con otros métodos estudiados.

Por otro lado, el límite de detección obtenido en nuestro método tiene un valor de 3,07 ppb (0,00307 $\mu\text{g/ml}$), mientras que otros métodos de la literatura muestran valores del límite de detección de 2,31 $\mu\text{g/ml}$ (29) y de 2,52 $\mu\text{g/ml}$ (30). Esto indica que nuestro método es capaz de detectar y medir con fiabilidad unas concentraciones menores de imidazol con respecto a los otros métodos indicados.

Se puede concluir entonces que el método HPLC-DAD descrito es preciso y exacto ya que ha sido validado con éxito y que, además, es bastante sensible teniendo en cuenta los valores de LOD y LOQ que se han obtenido.

5.3. SELECCIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN/LAVADO DE IMIDAZOL

Las condiciones de extracción/lavado del imidazol usando agua como disolvente se intentaron optimizar para que la concentración de imidazol en las nanoesponjas sea igual o inferior a 0,1% (masa imidazol/masa CD-NS).

A continuación, se muestran los resultados de la concentración de imidazol presente en el agua de los lavados en las diferentes condiciones ensayadas (tablas 8, 9, 10 y 11), que han sido previamente indicadas en la tabla 2.

Tabla 8. Concentraciones de imidazol extraído en las condiciones de ultrasonidos con 2 y 4 ml de agua a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas.

Condiciones de volumen y tiempo	Concentración (ppm)
2 ml 0h	51,9672
2 ml 2h	18,0778
2 ml 4h	5,1523
2 ml 6h	1,9247
2 ml 8h	0,9574
4 ml 0h	49,1890
4 ml 2h	10,7811
4 ml 4h	1,9800
4 ml 6h	0,6214
4 ml 8h	0,2880

Tabla 9. Concentraciones de imidazol extraído en las condiciones de 600 rpm y 40°C, con 2 y 4 ml de agua a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas.

Condiciones de volumen y tiempo	Concentración (ppm)
2 ml 0h	54,1460
2 ml 2h	19,7931
2 ml 4h	6,2832
2 ml 6h	2,3860
2 ml 8h	1,2281
4 ml 0h	50,5344
4 ml 2h	11,6571
4 ml 4h	2,2731
4 ml 6h	0,6027
4 ml 8h	0,2682

Tabla 10. Concentraciones de imidazol extraído en las condiciones de 600 rpm y 70°C, con 2 y 4 ml de agua a las 0, 2 y 4 horas.

Condiciones de volumen y tiempo	Concentración (ppm)
2 ml 0h	48,4254
2 ml 2h	29,3590
2 ml 4h	6,118
4 ml 0h	46,0691
4 ml 2h	15,2438
4 ml 4h	2,8145

Tabla 11. Concentraciones de imidazol extraído en las condiciones de 1000 rpm y 40°C, con 2 y 4 ml de agua a las 0, 2 y 4 horas.

Condiciones de volumen y tiempo	Concentración (ppm)
2 ml 0h	47,9207
2 ml 2h	20,2562
2 ml 4h	6,6151
4 ml 0h	45,6283
4 ml 2h	11,5651
4 ml 4h	2,3047

Como se puede observar en las tablas 8, 9, 10 y 11; las mayores concentraciones de imidazol cuantificadas en el agua corresponden al tiempo 0, lo cual es lógico ya que se trata del primer lavado realizado y es el momento en el que más imidazol libre y retenido hay en la estructura de la nanoesponja de ciclodextrina. Además, se puede apreciar que la concentración es mayor en el caso de haber realizado los lavados en un menor volumen de agua (2 ml). Conforme va aumentando el tiempo de lavado, se van obteniendo menores concentraciones de imidazol en el agua, lo que indica que en la nanoesponja cada vez queda menos imidazol retenido.

No se aprecian grandes diferencias entre el imidazol extraído en las condiciones de ultrasonidos y en las de agitación. Por ello, escogeríamos las condiciones de agitación por tratarse de un método menos costoso de lavado.

Por otra parte, en las variables de temperatura y velocidad de agitación tampoco se aprecia que influyan en gran medida en el proceso de lavado. Si comparamos las condiciones de 600 rpm y 40°C (tabla 9), y 1000 rpm y 40°C (tabla 11) observamos que al inicio se consigue extraer más imidazol en el primer caso, mientras que a las 2 y 4 horas prácticamente se logra extraer la misma cantidad de imidazol, por lo que no resultaría muy rentable aumentar la velocidad de agitación a 1000 rpm.

Nos quedaríamos con las condiciones de 600 rpm y 40°C, y lavaríamos las nanoesponjas de ciclodextrina con 4 ml de agua durante unas 8 horas. Así, lograríamos extraer el imidazol necesario para que la CD-NS está limpia y libre de contaminantes.

Con estos resultados obtenidos determinamos la cantidad total de imidazol que se ha eliminado de las nanoesponjas de ciclodextrina al final de todo el proceso de lavado.

Para poder evaluar si la extracción ha resultado efectiva, calculamos la cantidad de imidazol teórica teniendo en cuenta la cantidad de CDI utilizada en la síntesis. Para realizar la síntesis de la nanoesponja de ciclodextrina habíamos partido de 3,38 g de monómeros de α -ciclodextrina y de 2,25 g del agente de entrecruzamiento carbonildiimidazol (CDI), es decir, 5,63 g de producto final. Pasamos la masa de CDI a masa de imidazol:

$$2'25 \text{ g CDI} \cdot \frac{1 \text{ mol CDI}}{162'15 \text{ g CDI}} \cdot \frac{68'077 \text{ g imidazol}}{1 \text{ mol imidazol}} \cdot 2 = 1'89 \text{ g imidazol}$$

En un producto final de 5,63 g de nanoesponja de ciclodextrina hay presentes 1,89 g de imidazol.

Para realizar los procesos de lavado y cuantificar el imidazol presente en el agua, solamente tomamos 0,14 g de nanoesponja de ciclodextrina, lo que corresponde a una masa de imidazol de 0,047 g.

$$\frac{1'89 \text{ g imidazol}}{5'63 \text{ g nanosponja}} = \frac{x}{0'14 \text{ g nanosponja}} \rightarrow x = 0'047 \text{ g imidazol} = 47.000 \mu\text{g imidazol}$$

En la tabla 12 se puede apreciar, para cada una de las condiciones de extracción ensayadas, la cantidad de imidazol final extraída.

Tabla 12. Cantidad de imidazol extraído en cada una de las condiciones de extracción ensayadas.

Condiciones de extracción	Imidazol extraído (µg)
Ultrasonidos, 2 ml	57189,62
Ultrasonidos, 4 ml	54657,24
600 rpm y 40°C, 2 ml	56084,12
600 rpm y 4°C, 4 ml	60454,85
600 rpm y 70°C, 2 ml	55819,59
600 rpm y 70°C, 4 ml	53667,07
1000 rpm y 40°C, 2 ml	53294,95
1000 rpm y 40°C, 4 ml	51176,19

Podemos ver que la máxima cantidad de imidazol que se ha podido extraer en estas condiciones mencionadas han sido 60454,85 µg, siendo 47000 µg la masa de imidazol que teóricamente se encuentra presente en la CD-NS al inicio del proceso de lavado. Es decir, que el valor de imidazol que se ha extraído es superior al valor teórico. Esto puede deberse al error que se ha acumulado de todas las determinaciones para una misma muestra y también por el hecho de haber realizado solo una réplica de cada una de ellas.

Se puede concluir entonces que el proceso de extracción/lavado ha resultado muy efectivo ya que se ha logrado extraer una gran cantidad de imidazol, e incluso los valores obtenidos han sido superiores a los teóricos, cuya causa se ha comentado anteriormente.

En la literatura, los procesos de lavado de las CD-NS han sido realizados con agua a una temperatura de 40°C, y el análisis del agua de lavado se ha llevado a cabo retirando alícuotas a las 2, 4, y 8 horas; de la misma forma que en nuestro método.

Sin embargo, en la literatura se ha determinado la cantidad de nitrógeno que hay presente en las CD-NS secas, en lugar de la de imidazol, siendo este para las CD-NS con un ratio molar de CD:CDI 1:4 de 0,2% al final de 8 horas de lavado (2). Nuestros resultados parecen indicar que el porcentaje de nitrógeno en nuestro caso podría ser inferior al reportado, ya que sería de esperar que no fuera detectado nitrógeno en las CD-NS ya que parece que el imidazol se ha extraído completamente, aunque este dato tendría que ser confirmado.

6. CONCLUSIONES

El nuevo método mecano-químico utilizado para la síntesis de nanoesponjas de ciclodextrina (CD-NS) resulta una adecuada alternativa a la ruta convencional de producción de este compuesto, puesto que reduce el gasto de energía y el uso de disolventes tóxicos; además de ser una técnica que se encuentra en auge en la actualidad. Como consecuencia del proceso de síntesis, moléculas de imidazol quedan retenidas en la estructura de las CD-NS y deben ser eliminadas al máximo mediante sucesivos lavados, ya que resultan contaminantes para el producto final y no van a permitir su incorporación a los nuevos envases activos.

El desarrollo y validación de un método de HPLC-DAD para la cuantificación de imidazol en las CD-NS ha resultado fundamental para inferir sobre la presencia de imidazol en estos compuestos. Para ello, la linealidad, precisión interdía, precisión intradía y precisión intermedia han sido analizadas durante 5 días; y se ha determinado el coeficiente de variación y error relativo medio para cada uno de los parámetros. El proceso de validación ha resultado con éxito puesto que, para todos los parámetros evaluados, los valores del coeficiente de variación y error relativo medio obtenidos se encuentran dentro de los límites de aceptabilidad; que han sido establecidos por la Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drug Administration, FDA) y por el Consejo Internacional de Armonización (ICH).

Por otra parte, también se ha determinado el límite de detección y el límite de cuantificación del método, obteniendo para ambos parámetros valores inferiores a otros descritos en la literatura; concluyendo así que el método es sensible y capaz de medir con exactitud y precisión confiables unas concentraciones muy bajas de imidazol.

Finalmente, el método validado se ha aplicado a la determinación de imidazol en el proceso de síntesis de las CD-NS analizando el agua de los lavados en diferentes condiciones de extracción, ya sea con temperatura o con el sistema de ultrasonidos. Las mayores cantidades de imidazol que se han logrado extraer durante el proceso de lavado corresponden a las condiciones de 600 rpm, a una temperatura de 40°C en 4 ml de agua; a pesar de que no se han apreciado grandes diferencias entre el resto de las condiciones ensayadas. Por tratarse del método menos costoso de lavado, han sido las seleccionadas.

Se puede decir que el proceso de extracción/lavado de las CD-NS ha resultado muy efectivo ya que se ha conseguido extraer una gran cantidad de imidazol, incluso se han superado los valores teóricos de imidazol, lo que puede deberse a la acumulación de error en las sucesivas determinaciones de imidazol por HPLC-DAD y también por la pequeña cantidad de muestra utilizada.

Concluimos que gracias al método desarrollado y validado se ha podido determinar si la CD-NS se encuentra limpia y libre de contaminantes.

CONCLUSIONS

The new mechano-chemical method used for the synthesis of cyclodextrin nanosponges (CD-NS) is an appropriate alternative to the conventional production route of this cross-linked polymer, as it reduces energy waste and the use of toxic solvents, besides being a technique that is currently thriving. As a consequence of the synthesis process, imidazole molecules are retained within the structure of the CD-NS and they must be from the polymer because they are contaminants for the final product and will not allow their incorporation into the new packaging material.

The development and validation of an HPLC-DAD (high-resolution liquid chromatography with diode array detection) method for imidazole quantification in CD-NS has been essential to evaluate the amount of imidazole in the CD polymer. For this purpose, linearity, interday precision, intraday precision and intermediate precision have been analysed during 5 days through the determination of parameters such as the coefficient of variation and the mean relative error or bias. Method validation has been successful because, for all the parameters evaluated, the values of the coefficient of variation and mean relative error or bias were within the limits of acceptability established by the US Food and Drug Administration (FDA) y the International Council for Harmonization (ICH).

Additionally, very low detection (3,07 ppb) and quantification (0,1 ppm) limits have been achieved, obtaining values for both parameters lower than those described in the literature. This concludes that the method is sensitive and able of measuring really low concentrations of imidazole with reliable accuracy and precision.

Finally, the validated method has been applied to imidazole quantification during the extraction process from the CD-NS by analysing the extraction/washing water in different extraction conditions, either with temperature and agitation or with an ultrasonic bath. The highest imidazole concentrations that have been extracted during the washing process were obtained by performing the extraction with 4 ml of water at 40°C and 600 rpm. These conditions have been selected because they are the least expensive extraction method. However, no noticeable differences have been observed between the rest of the tested conditions.

It can be said that the CD-NS extraction/washing process has been highly effective as, due to this process, it has been possible to extract a great amount of imidazole with obtained imidazole amounts being higher than the theoretical values which can be due to the error accumulation during the successive imidazole determinations by HPLC-DAD and also because of the small sample size used.

We can conclude that thanks to the developed and validated method, it has been possible to determine whether the CD-NS are clean and free of contaminants.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Serra J, Tutora M, Santa D, Gutiérrez M. TRABAJO DE FIN DE MÁSTER MÓDULO DE QUÍMICA ORGÁNICA ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LAS CICLODEXTRINAS Y DERIVADOS UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA FACULTAD DE CIENCIAS MÁSTER EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA. 2016.
2. Pedrazzo AR, Caldera F, Zanetti M, Appleton SL, Dhakar NK, Trotta F. Mechanochemical green synthesis of hyper-crosslinked cyclodextrin polymers. *Beilstein J Org Chem*. 2020;16(Cdi):1554–63.
3. Trotta F, Zanetti M, Cavalli R. Cyclodextrin-based nanosponges as drug carriers [Internet]. Vol. 8, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. Beilstein-Institut; 2012. p. 2091–9. Available from: <https://www.beilstein-journals.org/bjoc/articles/8/235>
4. Trotta F, Caldera F, Cavalli R, Soster M, Riedo C, Biasizzo M, et al. Molecularly imprinted cyclodextrin nanosponges for the controlled delivery of L-DOPA: perspectives for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2016;13(12):1671–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2017.1248398>
5. Takacs L. The historical development of mechanochemistry. *Chem Soc Rev*. 2013;42(18):7649–59.
6. Molino de bolas planetario PM 100 - RETSCH - granulometría más alta [Internet]. Available from: <https://www.retsch.es/es/productos/molienda/molinos-de-bolas/molinos-planetarios-bolas-pm-100/funcionamiento-caracteristicas/>
7. Burmeister CF, Kwade A. Process engineering with planetary ball mills. *Chem Soc Rev*. 2013;42(18):7660–7.
8. Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto JC, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll*. 2009;23(7):1631–40.
9. Pellicer JA. Aplicación de ciclodextrinas en distintos sectores industriales: biotecnología enzimática, industria alimentaria y descontaminación de aguas. Tesis doctoral. 2016;268. Available from: <http://repositorio.ucam.edu/bitstream/handle/10952/1916/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
10. AESAN. Los alimentos que se pueden colocar en el mercado de la UE en virtud del artículo 4.2, primer guión del reglamento (CE) N ° 258/97. 2016;200:5–6. Available from: http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/TABLA_AUTORIZACION_NUEVOS_ALIMENTOS.pdf
11. País Evaluador Producto autorizado/ destinatario decisión Usos autorizados Descripción Especificaciones.
12. Instituto Tecnológico de la Industria Agroalimentaria (AINIA). Informe de vigilancia tecnológica. Tendencias en la tecnología de envasado activo. 2015;1–110.
13. ICSC 1721 - IMIDAZOL [Internet]. Available from:

- https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=1721&p_version=1&p_lang=es
14. Azoles C 4. AMPLIACION DE QUÍMICA ORGÁNICA AVANZADA. QUÍMICA DE HETEROCICLOS.
 15. Zhu Y, Ren H, Wei Y, Bie Z, Ji L. Determination of Imidazole, 4-Methylimidazole, and 2-Methylimidazole in Cigarette Additives by Ultra-High Performance Liquid Chromatography. *Anal Lett.* 2015;48(17):2708–14.
 16. (PDF) High performance liquid chromatography: A short review [Internet]. Available from:
https://www.researchgate.net/publication/235987484_High_performance_liquid_chromatography_A_short_review
 17. Bélanger JMR, Jocelyn Paré JR, Sigouin M. Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. *Tech Instrum Anal Chem.* 1997;18(C):37–59.
 18. Mixed-Mode HPLC Separations: What, Why, and How [Internet]. Available from:
<https://www.chromatographyonline.com/view/mixed-mode-hplc-separations-what-why-and-how>
 19. Wang Q, Ye M, Xu L, Guo Shi Z. A reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode C18-Diol stationary phase for multiple applications. *Anal Chim Acta.* 2015;888:182–90.
 20. Rohrer JS, Xu Q, Chen J, Luo J, Li L, Corporation D. Application of Mixed-Mode HPLC Columns to Samples Containing Ionic and Hydrophobic Analytes. :2–6.
 21. Dolan J. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. *WwwAce-HplcCom* [Internet]. 2012; Available from:
https://www.google.es/search?site=&source=hp&q=A+Guide+to+HPLC+and+LC-MS+Buffer+Selection&oq=A+Guide+to+HPLC+and+LC-MS+Buffer+Selection&gs_l=hp.3..0.1545.1545.0.3483.2.2.0.0.0.541.694.0j1j5-1.2.0....0...1c.1.64.hp..1.1.151.0.SRClnw-mBP0#
 22. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. *Fda* [Internet]. 2001;(May):4–10. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>
 23. Silva F, Figueiras A, Gallardo E, Nerín C, Domingues FC. Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: A comparative study between cyclodextrins and bile acids. *Food Chem* [Internet]. 2014;145:115–25. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.034>
 24. Boqué R. EL LÍMITE DE DETECCIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.
 25. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* 2011;2(1):21.
 26. Columna ACQUITY UPLC BEH HILIC, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 50 mm, 3 / paq. - 176001092: Waters [Internet]. Available from:
<https://www.waters.com/nextgen/es/es/shop/columns/176001092-acquity-uplc-beh-hilic-column-130a-17--m-21-mm-x-50-mm-3-pk.html>

27. Zakeri-Milani P, Islambulchilar Z, Majidpour F, Jannatabadi E, Lotfpour F, Valizadeh H. A study on enhanced intestinal permeability of clarithromycin nanoparticles. *Brazilian J Pharm Sci.* 2014;50(1):121–9.
28. Calibration Curves, Part V: Curve Weighting [Internet]. Available from: <https://www.chromatographyonline.com/view/calibration-curves-part-v-curve-weighting>
29. Chou WL, Chang CY, Liu HM, Yang KC, Wu CC. Supercritical fluid extraction of imidazole drugs from cosmetic and pharmaceutical products. *J Food Drug Anal.* 2007;15(1):25–32.
30. Velikinac I, Čudina O, Janković I, Agbaba D, Vladimirov S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations. *Farmaco.* 2004;59(5):419–24.

8. ANEXOS

ANEXO 1. FIGURAS DEL MOLINO DE BOLAS PLANETARIO



A1. Molino de bolas planetario PM100 utilizado para el proceso de alienación mecánica. Fuente: (6).



A2. Recipiente de molienda junto con las bolas de circonio. Fuente: (6).



A3. Visión interior del molino de bolas planetario, con su sistema de ajuste. Fuente: (6).



A4. Visión interior del molino de bolas planetario, con su sistema de ajuste. Fuente: (6)