

ELKIN DARIO CASTELLON CASTRILLON

**NANOSENSORES OPTICOS DE POLIDIACETILENO PARA EL
RECONOCIMIENTO DE MOLECULAS DE INTERES AMBIENTAL Y
ALIMENTICIO**

Tesis presentada a la Universidade Federal de Viçosa, como parte de los requisitos del Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para obtener el título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C348n
2013
Castellon Castrillon, Elkin Dario, 1980-
Nanosensores opticos de polidiacetileno para el
reconocimiento de moléculas de interes ambiental y
alimentício / Elkin Dario Castellon Castrillon. - Viçosa,
MG, 2013.

xv, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Maria do Carmo Hespanhol da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.53-56.

1. Polidiacetileno. 2. Copolímeros triblocos.
3. Nanosensores. 4. Melamina. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Química. Mestrado em
Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 630.247611

ELKIN DARIO CASTELLON CASTRILLON

**NANOSENSORES OPTICOS DE POLIDIACETILENO PARA EL
RECONOCIMIENTO DE MOLECULAS DE INTERES AMBIENTAL Y
ALIMENTICIO**

Tesis presentada a la Universidade Federal de Viçosa, como parte de los requisitos del Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para obtener el título de *Magister Scientiae*.

APROBADA: 29 de Julio de 2013

Ana Clarissa dos Santos Pires

Willian Toito Suarez

Maria do Carmo Hespanhol da Silva
(Orientadora)

*A mi familia en especial a mi madre por su apoyo incondicional.
A mis hermanos Adriana, Andrés, Humberto, Max y Canela por creer en mí.
Dedico este trabajo.*

"Después de algún tiempo aprenderás la diferencia entre dar la mano y socorrer a un alma y aprenderás que amar no significa apoyarse, y que compañía no siempre significa seguridad.

Comenzarás a aprender que los besos no son contratos, ni regalos, ni promesas. Comenzarás a aceptar tus derrotas con la cabeza erguida y la mirada al frente, con la gracia de un niño y no con la tristeza de un adulto y aprenderás a construir hoy todos tus caminos, porque el término mañana es incierto para los proyectos y el futuro tiene la costumbre de caer en el vacío. Después de un tiempo aprenderás que el sol quema si te expones demasiado.

Entonces y solo entonces, sabrás realmente lo que puedes soportar, que eres fuerte y que podrás ir, mucho más lejos, que cuando creías que no se podía más. Es que realmente la vida vale más cuando tienes valor de enfrentarla."

William Shakespeare

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y por colocarme en el camino con aquellos que me hacen mejor ser humano.

A la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por la beca de estudios.

Al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a la Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) y al Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) por el apoyo financiero al proyecto.

A la Universidade Federal de Viçosa, el Programa de Pós-graduação em Agroquímica y a la Organización de Estados Americanos (OEA) por posibilitar la realización de este trabajo.

Agradezco de forma especial a la profesora Maria do Carmo Hespanhol da Silva por la orientación, paciencia, apoyo, enseñanza, ejemplo, carácter y por toda la confianza que en mí deposito.

Agradezco al profesor Luis Henrique Mendes da Silva por la co-orientación, paciencia, amistad, enseñanza, ejemplo y generosidad que junto a Maria do Carmo hicieron mi vida más agradable en este lugar.

A mis amigos de QUIVECOM por el apoyo, amistad y excelente ambiente de trabajo. En especial a Juan, Vivianne, Gabriel, Guilherme, Jardel, Paulo, Pamela, Rose, Jeanderson y Luis, por la ayuda.

A mis amigos Álvaro Javier, Jose Luis y Nicol por la confianza y ese apoyo desinteresado.

A mi novia por haber llegado en el momento justo y convertirse en pieza fundamental de mi éxito en este trabajo.

A mi familia, Daniela, Adriana, Andrés, Humberto, Rebeca mi madre y Lorenzo mi abuelo por empujarme a esta experiencia que ha sido maravillosa, Tomas, Ivan, Patricia, Kimberli, Canela y Max.

A todos los que creyeron que yo era capaz.

SUMARIO

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
RESUMEN.....	xv
CAPITULO 1: Revisión de literatura.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Polidiacetilenos.....	1
1.3 Copolímeros Tribloque.....	7
1.4 Benceno Y SOLVENTES CLORADOS.....	11
1.5 Melamina.....	16
CAPITULO 2.....	26
2.1 Objetivos.....	26
2.2 Método experimental.....	27
2.2.1 Síntesis de Vesícula.....	27

2.2.2	Síntesis de Nanoblendas.....	27
2.2.3	RC de vesículas de PCDA y nanoblendas de PCDA/copolímero tribloque en presencia de diferentes analitos	28
2.2.4	Estudio del pH en la RC de nanoblendas de PCDA/L64 en presencia de melamina	29
2.2.5	RC de Nanoblendas de monómeros de TCDA Sintetizadas en L64 1,0% (m/m) en presencia de melamina.....	29
 CAPITULO 3: Resultados y discusión.....		 31
3.1	Espectro UV-vis de las Vesículas y Nanoblendas.....	31
3.2	Nanosensor para determinación de Benceno.....	35
3.3	Aplicación del Nanosensor para diferentes compuestos clorados.....	40
3.4	Aplicación del Nanosensor óptico para Melamina.....	43
 CAPITULO 4: Conclusiones.....		 51
 CAPITULO 5: Bibliografía.....		 53

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

PDAs – Polidiacetilenos.

UV – Ultravioleta

vis– Visible

m/m– masa / masa

RMN – Resonancia Magnética Nuclear

PCDA – Acido 10, 12 – pentacosadiynoico

TCDA – Acido 10, 12 – Tricosadiynoico

ITC – Microcalorimetría de Titulación Isotérmica

DA – Diacetileno

EO – Óxido de Etileno

PO – Oxido de Propileno

cmc – Concentración micelar critica

CMT – Temperatura critica de micelación

ΔG_m – Variación de la energía libre de Gibbsmicelar

ΔH_m – Variación de la entalpia en un proceso de micelización

ΔS_m – Variación de la entropía en un proceso de micelización

T – Temperatura

COVs – Compuestos orgánicos volátiles

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ – microgramos por metro cubico

ppb – Partes por billón

ng/dm³ – nanogramos por decímetro cubico

FIL – Federación Internacional de Lechería

g/L – Gramos por litro

°C – Grados centígrados

IARC – International Agency for Research on Cancer

L/kg – Litro por kilogramo

mg/kg – miligramo por kilogramo

EFSA – Agencia Europea de Seguridad Alimentaria

GC – Cromatografía de gases

HPLC – Cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-MS/MS – Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem.

HPLC-MS – Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría de masas

CG-MS - Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

HPLC-UV - Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrometría ultravioleta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotopolimerización de los monómeros de diacetileno por luz ultravioleta.....	2
Figura 2	Espectros típicos ultravioleta – visible (UV-vis) de los Polidiacetilenos.....	3
Figura 3	Transformación estructural de enlaces dobles y triples conjugados a forma de butatrieno.....	3
Figura 4	Estructuras representativas en la transformación de monómeros a polímeros y sus orbitales π de los PDAs.....	4
Figura 5	Formas conformacionales de los PDAs.....	4
Figura 6	Diferentes arquitecturas de copolímeros, dibloque, tribloque, de injerto y en estrella.....	7
Figura 7	Copolímero tribloque de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno).....	7
Figura 8	Estructura de la melamina.....	18
Figura 9	Estructuras químicas de la melamina y sus metabolitos.....	18
Figura 10	Estructura química del cianurato de melamina.....	19
Figura 11	Espectro de absorción de vesículas de PCDA sin benceno y con benceno (a) y espectro de absorción de nanoblendas de PCDA/L64 sin benceno y con benceno (b).....	31
Figura 12	Espectro de absorción de nanoblendas de PCDA/L64 a diferentes concentraciones de L64.....	32
Figura 13	Curva de la absorbancia de las nanoblendas de PCDA/L64 en función de la concentración de L64.....	33
Figura 14	Agregados macromoleculares formados por monómeros de	

	copolímero tribloque.....	33
Figura 15	Espectros electrónicos de nanoblendas de PCDA en diferentes copolímeros tribloque a concentración 1% (m/m).....	34
Figura 16	Respuesta colorimétrica de nanoestructuras tipo vesícula (azul) o nanoblendas (verde) en función de la concentración de benceno.....	36
Figura 17	Fotografía de la dispersión de vesículas con adición de benceno	36
Figura 18	Fotografía de la dispersión de las nanoblendas con adición de benceno.....	37
Figura 19	Respuesta Colorimétrica de nanoblendas sintetizadas en diferentes concentraciones de copolímero tribloque L64 con adición de benceno.....	38
Figura 20	Respuesta Colorimétrica de vesícula de PCDA, con adición de diferentes derivados del Benceno.....	39
Figura 21	Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA, sintetizadas en diferentes concentraciones de copolímero tribloque L64, con adición de Diclorometano.....	40
Figura 22	Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA, sintetizadas en diferentes concentraciones de copolímero tribloque L64, con adición de Cloroformo.....	41
Figura 23	Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA, sintetizadas en diferentes concentraciones de copolímero tribloque L64, con adición de Tetracloruro de carbono.....	42
Figura 24	Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA, sintetizadas en copolímero tribloque L64 1% (m/m), con adición de Solventes Clorados.....	43
Figura 25	RC de las vesículas clásicas de PCDA y las nanoblendas de PCDA/L64.....	44

Figura 26	Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA sintetizadas en copolímero tribloque L64 en diferentes concentraciones, con adición de Melamina.....	45
Figura 27	Estudio del pH de las nanoblendas de PCDA sintetizadas en copolímero tribloque L64 0,1 y 1% (m/m), con adición de Melamina.....	47
Figura 28	RC para Melamina formado por nanoblendas de PCDA sintetizadas en diferentes copolímero tribloques (L64; F68; F127 y P123) todos al 1% (m/m).....	48
Figura 29	Estructuras de los PDAs usados.....	49
Figura 30	RC para Melamina formado por nanoblendas de PCDA y TCDA en L64 1% (m/m).....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Los métodos cromatograficos para el análisis de benceno en diversas matrices.....	13
Tabla 2	Máximas concentraciones permisibles de los compuestos de interés.....	15
Tabla 3	Límites de detección de solventes clorados de interés por CG-ECD.....	16
Tabla 4	Propiedades fisicoquímicas de la melamina y metabolitos.....	20
Tabla 5	Metodologías analíticas desarrolladas para la determinación de melamina y compuestos análogos.....	24
Tabla 6	Estructura química y composición de copolímeros tribloques.....	28
Tabla 7	Compuestos derivados del benceno usados.....	39

RESUMO

CASTELLÓN CASTRILLON, Elkin Dario, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Nanosensores Óticos de Polidiacetileno para o Reconhecimento de Moléculas de Interesse Ambiental e Alimentício.** Orientadora : Maria do Carmo da Silva Hespanhol . Co-orientador : Luis Henrique Mendes da Silva .

Neste trabalho , propomos a síntese de um nanosensor óptico para a detecção de benzeno, solventes clorados e melamina , novas nanoestruturas baseadas em polydiacetylene (PDA), que são formados por monômeros de ácido 10,12 - pentacosadiinóico (PCDA) auto-organizada significa tribloco anfifílico composto . O efeito da estrutura química e do balanço de copolímeros tribloco hidrofóbicos e hidrofílicos em resposta colorimétrica (CR) de nanoblendas PCDA / copolímero tribloco vesículas PCDA comparando-os na presença de benzeno. O espectro no ultravioleta-visível electrónico mostra que a maior intensidade da luz absorvida nanoblenda é devido a um maior rendimento da reacção de polimerização do diacetileno monómeros nanoblenda na vesícula . O efeito da estrutura química da transição clorado nanoblendas colorimétricos de PCDA/L64 . Mostrando PCDA/L64 sensibilidade nanosensor tem a mesma limite de detecção para o clorofórmio e tetracloreto de carbono . Portanto, este é verificado nanosensor não especifica para qualquer um destes compostos clorados, pode-se distinguir uma variedade de concentrações entre diclorometano e dois solventes clorados. Determinado a contribuição relativa dos diferentes interacções intermoleculares de transição nanoblendas colorimétrico PCDA / tribloco causada por interacção com as moléculas de melamina . Confirmando a concentração mínima necessária para a melamina máximo ocorre a transição colorimétrico permanece a mesma , assim, a transição colorimétrica é iniciada a níveis mais baixos de melamina mayores. Este nanoestruturas novas regiões hidrófilas nanosensor foi eficiente na detecção de melanina.

ABSTRACT

CASTELLON CASTRILLON, Elkin Darío, M.Sc., Universidade federal de Viçosa, July 2013. **Nanosensors Optical of Polydiacetylene for Recognition of Molecules of Interest Environmental and Nutritional.** Adviser: Maria do Carmo Hespanhol da Silva. Co-Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva.

In this paper we propose the synthesis of an optical nanosensor for the detection of benzene, chlorinated solvents and melamine, novel nanostructures based on polydiacetylene (PDA) that are formed by monomers 10,12-pentacosadiinóico acid (PCDA) self-organized means amphiphilic triblock composed. The effect of the chemical structure and the balance of hydrophobic and hydrophilic triblock copolymers in colorimetric response (CR) of comparing with PCDA/L64 nanoblends PCDA vesicles in the presence of benzene. The UV-vis electronic spectrum shows that the largest intensity of the light absorbed nanoblend is due to a higher yield of the polymerization reaction of the diacetylene monomers nanoblenda that in the vesicle. Possibly due to the intermolecular interaction between benzene and propylene oxides alter the interaction between propylene oxide and PCDA reducing the rotational barrier of the carbon - carbon PCDA molecules allowing color change from blue to red. The effect of the chemical chlorinated structure of the transition colorimetric nanoblends of PCDA/L64. Showing PCDA/L64 nanosensor sensitivity has the same detection limit for chloroform and carbon tetrachloride. So this is verified nanosensor not specific for any of these chlorinated compounds may then distinguish a range of concentrations between dichloromethane and two chlorinated solvents. Determined the relative contribution of different intermolecular interactions to transition nanoblendas colorimetric PCDA / triblock caused by interaction with molecules of melamine. Showing that keeping the size of the hydrophobic region and the hydrophilic region growing by comparing nanoblends different copolymers, it is verified that the minimum concentration needed for melamine maximum occurs colorimetric transition remains the same, thus the colorimetric transition starts at concentrations melamine under nanostructures higher hydrophilic regions. This new nanosensor was efficient in detecting melamine.

RESUMEN

CASTELLÓN CASTRILLON, Elkin Darío, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julio de 2013. **Nanosensores Opticos de Polidiacetileno para el Reconocimiento de Moleculas de Interes Ambiental y Alimenticio.** Orientadora: Maria do Carmo Hespanhol da Silva. Coorientador: Luis Henrique Mendes da Silva.

En este trabajo se propone la síntesis de un nanosensor óptico para la detección de benceno, solventes clorados y melamina, partiendo de nuevas nanoestructuras de polidiacetileno (PDA) que son constituidas por monómeros de ácido 10,12-pentacosadiinóico (PCDA) auto-organizados en medios anfifílicos compuestos por copolímeros tribloque. Se Investigó el efecto de la estructura química y del balance hidrofóbico e hidrofílico de los copolímeros tribloques en la respuesta colorimétrica (RC) de las nanoblendas PCDA/copolímero tribloque comparándolas con vesículas de PCDA en presencia de benceno. El espectro electrónico ultravioleta-visible muestra que la mayor intensidad de luz absorbida es de la nanoblenda, debido a un mayor rendimiento de la reacción de polimerización de los monómeros de diacetileno en la nanoblenda que en la vesícula. Se determinó el efecto de la estructura química de compuestos clorados sobre la transición colorimétrica de las nanoblendas de PCDA/L64. Mostrando que la sensibilidad del nanosensor PCDA/L64 posee el mismo límite de detección para el cloroformo y tetracloruro de carbono. Se verifica así que este nanosensor no es específico para ninguno de estos compuestos clorados, pudiendo distinguir un intervalo de concentraciones entre diclorometano y los otros dos solventes clorados. Se determinó la contribución relativa de las diferentes interacciones intermoleculares para la transición colorimétrica de las nanoblendas PCDA/copolímero tribloque causada por interacción con moléculas de melamina. Confirmando la concentración mínima de melamina necesaria para que ocurra la máxima transición colorimétrica permanece igual, por lo tanto la transición colorimétrica se inicia en concentraciones menores de melamina para nanoestructuras con regiones hidrofílicas mayores. Este nuevo nanosensor se mostró eficiente en la detección de melanina.

CAPITULO 1

REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1 INTRODUCCION

Actualmente una demanda de gran interés en la sociedad científica, es el desarrollo de sistemas con nuevas tecnologías que permitan el desarrollo de dispositivos en una escala de nanómetros que respondan a un estímulo físico-químico de manera específica y mensurable, para ser fácilmente aplicadas en la detección de diferentes analitos a un bajo costo.

Los polidiacetilenos (PDAs) han recibido mucha atención en los últimos años, debido a aspectos tecnológicos potencialmente importantes. Sus características ópticas únicas que comprenden el cambio de color de azul para rojo cuando su estructura es perturbada de forma mecánica (mecanocromismo), por variaciones en la temperatura (termocromismo) o por interacciones intermoleculares con diferentes sustancias de interés químico y biológico [1]. son polímeros que fueron sintetizados por primera vez por Wegner [2] en 1969, sin embargo solo hasta 1993 que Charych [3] y colaboradores comenzaron a explorar su potencial como sensor, utilizaron una película de PDA con ácido siálico para el reconocimiento del virus de la influenza. A partir de este momento las investigaciones en las que hacían parte los PDA comenzaron a tener gran importancia en la comunidad científica intentando desarrollar nuevos sensores químicos, biológicos y para aplicaciones en la industria electrónica [4,5].

Teniendo en cuenta la existencia de una serie de factores que promueven la transición de color en los PDAs, las investigaciones giran alrededor de los esfuerzos en la elucidación de los mecanismos que envuelven esta transición que no ha sido totalmente entendida, siendo así un factor limitante en la aplicación de estas estructuras en diferentes áreas de la ciencia.

1.2 POLIDIACETILENOS

Los PDAs son una clase de polímeros lineales que en su cadena carbonada principal presenta dobles y triples enlaces en forma alternada, constituidos por monómeros de diacetileno, en una reacción de adición 1,4 provocada por exposición a la luz ultravioleta (UV) a 254 nm, figura 1.

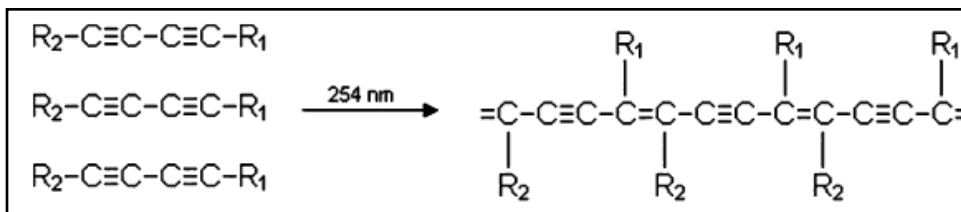


Figura 1. Fotopolimerización de los monómeros de diacetileno por luz ultravioleta.

En esta figura los sustituyentes R son los responsables por las características anfífilas de estas moléculas. Siendo R_1 un grupo con características polares y R_2 una cadena carbonada saturada. Más allá de eso, estos PDAs pueden formar diferentes estructuras auto-organizadas tales como: películas monomoleculares [6] o también multicapa [7] y nanoestructuras de tipo vesículas o micelas [8, 9,10]. En cualquiera de estas formas estructurales el sistema electrónico π -conjugado de la cadena carbonada, le aporta a estas moléculas características cromáticas cuando estas son sometidas a diferentes estímulos externos.

La absorción de la radiación de luz UV en estos materiales se da por la ruta π - π^* conjugado (π - π^*) en la sección conjugada del polímero. La figura 2 muestra el espectro electrónico de los PDAs presenta antes de la perturbación una banda de absorción típica en 640 nm y un hombro en 590 nm de tal forma que el sistema presenta un color azul. Después de la perturbación este sistema presenta bandas a 540 nm y un hombro a 490 nm que resultan de la transición electrónica mostrando una coloración roja.

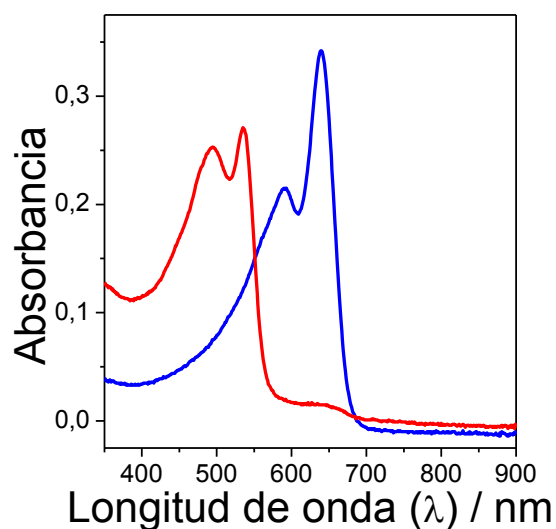


Figura 2. Espectros típicos ultravioleta – visible (UV-vis) de los PDAs.

El fundamento base sobre el mecanismo de transición de color en estas nanoestructuras, todavía es un desafío para la comunidad científica, una de varias propuesta sugeridas en diferentes trabajos sugiere que esta transición envuelve una transformación estructural en la conjugación de enlaces dobles y triples de la cadena carbonada principal a una forma de una butatrieno, en la que aparecen tres enlaces dobles seguidos uno del otro figura 3 [1,11].

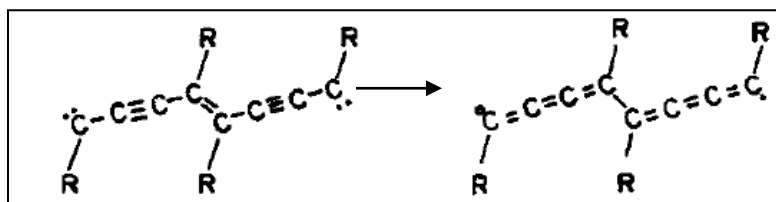


Figura 3. Transformación estructural de enlaces dobles y triples conjugados a forma de butatrieno.

Sin embargo, estudios espectroscópicos muestran que la forma en la que aparecen los dobles y los triples enlaces alternados están presentes en ambas faces [12,13].

La figura 4 muestra el fundamento acogido por este trabajo que propone que esta transición es el resultado de cambios conformacionales en la cadena

carbonada principal del polímero que genera una disminución en la longitud de la cavidad de los electrones π -conjugados.

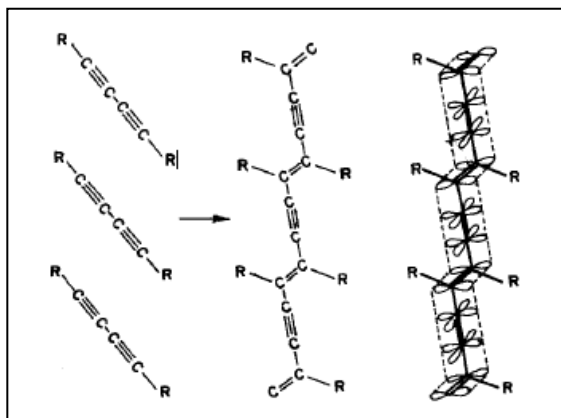
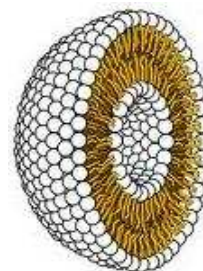


Figura 4. Estructuras representativas en la transformación de monómeros a polímeros y sus orbitales π de los PDAs.

Por lo tanto se propone que la forma azul de las moléculas tendría sus cadenas carbonadas en forma planar y la forma roja tendría una formación no planar [14]. Estudios que usan como técnica representativa resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia infrarrojo argumentan este modelo, por lo tanto se convierte en el más aceptado por la comunidad científica hasta la actualidad [15-18].

Existen diversas aplicaciones para cada uno de las formas en las cuales las moléculas de PDA pueden organizarse reflejadas en su mecanismo de transición. Pueden acomodarse en forma de películas supramoleculares (a) y hasta en estructuras tridimensionales en forma de vesículas (b) (figura 5).



(a) Películas supramoleculares de PDA [30]

(b) Vesículas de PDAs

Figura 5. Formas conformacionales de los PDAs.

Estas características se presentan por la facilidad con que los monómeros de diacetileno son estructurados y modificados. Convenientemente es posible modificar la cadena hidrocarbonada a través de reacciones químicas, incorporando grupos funcionales específicos en la cadena lateral, de esta forma se consiguen alterar las interacciones intermoleculares modificando la barrera energética rotacional de los polidiacetilenos, ejerciendo una diferencia en la energía de los estados conformacionales de la molécula.

La formación de estructuras de una dimensión fue estudiada por Russel y colaboradores [19] en 2004, insertando un grupo amino en la cadena lateral de los monómeros de diacetileno, formando pequeñas cavidades bien definidas en solventes orgánicos para detectar la actividad antibacteriana de estos compuestos.

La formación de estructuras en dos dimensiones es posible con la técnica de Langmuir-Blodgett, donde se depositan cantidades de solución acuosa de monómeros de diacetileno, para luego ser fijados en monocapas supramoleculares con un alto grado de orientación estructural formando películas finas y transparentes para luego ser fotopolimerizadas [20].

Las vesículas se caracterizan por su formación tridimensional que comprende un exterior y un centro hidrofílico separado por una región hidrofóbica (figura 5 b). Son agregados supramoleculares anfífilos que contienen bicapas laminares formando una estructura tipo membrana en soluciones acuosas.

La estabilidad de estos agregados es gobernada por las fuerzas de interacción entre los monómeros de diacetileno en el interior de la membrana, incluyendo fuerzas de Van der Waals, así como las fuerzas de estabilización estérica [21]. Las fuerzas atractivas entre las cadenas hidrofóbicas y las fuerzas de repulsión entre los grupos de cabeza hidrofílicos determinan la forma geométrica y el tamaño de la vesícula.

En la síntesis de estas estructuras tridimensionales los monómeros de diacetileno son disueltos en solvente orgánico y luego son hidratados, disminuyendo la temperatura del sistema induciendo a los monómeros a

orientarse en una conformación planar (trans) formando bicapas para luego ser fotopolimerizados.

Las propiedades cromáticas, fueron el motivo por el cual los investigadores usaron estas estructuras como sensores ópticos en varios estudios tales como transiciones colorimétricas generadas por biomoléculas [22, 23], solventes orgánicos [7, 24], temperatura [25], entre otros. La ecuación 1 muestra la forma cuantitativa de determinar la extensión de la transición de color, es un parámetro desarrollado por Charych (1993), donde propone la respuesta colorimétrica (RC) como la forma de cuantificar la perturbación del agente externo, convirtiéndose en una propiedad analítica del sensor.

$$RC = \left(\frac{\left(\frac{A_{azul}}{A_{azul}+A_{rojo}} \right)_a - \left(\frac{A_{azul}}{A_{azul}+A_{rojo}} \right)_b}{\left(\frac{A_{azul}}{A_{azul}+A_{rojo}} \right)_a} \right) \times 100 \quad (1)$$

Dónde: A_{azul} y A_{rojo} son las absorbancias en 640 nm y 540 nm, respectivamente y los índices a y b se refieren a las absorbancias antes y después de la perturbación.

Pires y colaboradores [26] en 2010 se enfocaron en el análisis de la energía asociadas a las transiciones colorimétricas generadas por las interacciones intermoleculares entre diferentes solventes orgánicos y las vesículas formadas por monómeros de ácido 10,12-pentacosadienoico (PCDA) y PCDA con colesterol más esfingomielina, usando la técnica de microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC). La respuesta colorimétrica de varios solventes clorados muestra la diferencia entre los dos tipos de sensores, mostrando una mayor respuesta en la vesícula de PCDA y una menor en la compuesta por colesterol y esfingomielina.

1.3 COPOLIMEROS TRIBLOQUE

Los copolímeros surgen como una forma alternativa de combinar monómeros de diferentes macromoléculas, mediante la construcción de otra macromolécula que contiene la variedad de propiedades de los monómeros que la componen. Dependiendo del procedimiento de polimerización, estos polímeros pueden presentar una variedad de arquitecturas moleculares, como, por ejemplo, las representadas en la figura 6.

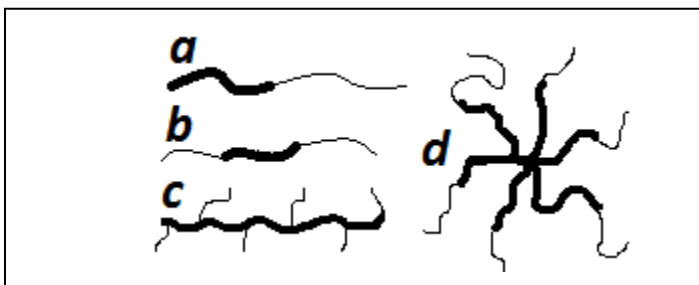


Figura 6. Diferentes arquitecturas de copolímeros, (a) dibloque, (b) tribloque, (c) de injerto y (d) en estrella.

Los copolímeros tribloque son macromoléculas compuestas por tres bloques alternados, compuestos de óxido de etileno (EO) y óxido de polipropileno (PO), de fórmula estructural EO-PO-EO. La figura 7 muestra como esta estructura es formada por bloques hidrofóbicos PO unidos a bloques hidrofílicos EO, propiedad que les permite tener un comportamiento anfifílico aprovechando la alta solubilidad en medio acuoso de las unidades EO y a su vez la baja solubilidad en este mismo medio de las unidades PO [27].

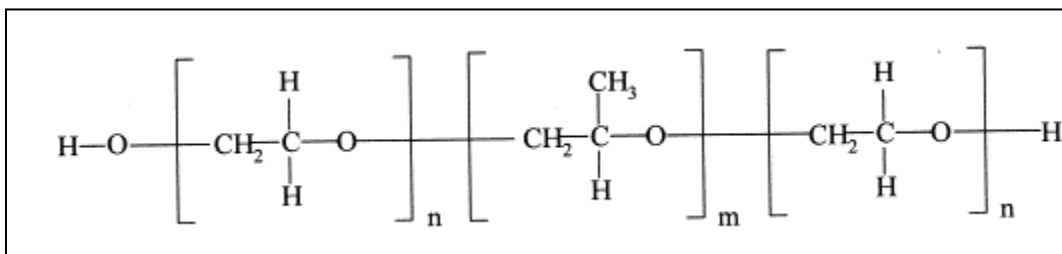


Figura 7. Copolímero tribloque de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno).

La hidratación de los bloques hidrofílicos de poli(óxido de etileno) se debe a su fácil interacción con la estructura del agua. Esta hidratación es altamente dependiente de la temperatura, por lo cual la solubilidad y la formación de agregados de los polímeros en bloques que contienen este grupo polar pueden ser reguladas por variaciones de la temperatura. Estos polímeros, que poseen un bajo costo y son biocompatibles, pueden adoptar distintas estructuras cuando se dispersan en agua, las que dependen de la proporción de cada uno de los bloques ($\text{EO}_n\text{-PO}_m\text{-EO}_n$) y de su masa molar relativa. Esta proporción también determina la solubilidad y el balance hidrofílico-hidrofóbico del polímero [28]. Estas estructuras son conocidas comercialmente como poloxámeros, pluronics o synperonics han sido parte fundamental en aplicaciones prácticas como detergentes, emulsionantes, agentes antiespumantes, dispersantes, o vehículos en formulaciones farmacéuticas [27-28].

Estos copolímeros están disponibles en pesos moleculares que van desde 1000 hasta 15.000 gramos en una mol ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), y con relaciones de EO/PO entre 10 y 80% en peso.

Estos copolímeros tienen nombres semisistemáticos o triviales que fueron impuestos por el uso y que generalmente se forman a partir del nombre de los monómeros de los cuales se obtienen. Los copolímeros pluronic se designan con letras y números. La letra "L" se utiliza para los líquidos, "P" para los que se presentan como pastas y F para los sólidos. El primer dígito, o los dos primeros en los números con tres dígitos, al multiplicar por 300 es aproximadamente igual a la masa molecular relativa promedio de la parte hidrofóbica. El último dígito, multiplicado por 10, indica el porcentaje en masa aproximado de la parte hidrofílica. Así, por ejemplo, el pluronic F68 es un copolímero sólido en el cual la masa molecular relativa aproximada de la parte hidrofóbica es 1800 (6×300) y la proporción en masa de la parte hidrofílica es aproximadamente 80% (8×10) [29].

Si un copolímero tribloque es disperso en una fase que actúa como un solvente favorable para uno de los bloques y a su vez desfavorable para el otro bloque, los unímeros del copolímero que se encuentran dispersos se asocian para formar agregados moleculares llamados micelas. Este proceso es dirigido por las

variaciones de concentración en un rango determinado y a una temperatura fija asociada al sistema.

En la primera etapa de agregación de unímeros a micelas, la concentración a la que las micelas comienzan a aparecer, es llamada concentración micelar crítica (cmc), de la misma forma, la temperatura a la que, para una concentración de copolímero se formen micelas, se denomina temperatura crítica de micelación (cmt) [28].

Los valores de la cmc de copolímeros son obtenidos por distintos métodos que generalmente evidencian diferencias apreciables, esto es debido a que la sensibilidad de estas técnicas varía en el cálculo del número de unímeros presentes en el sistema. Estas diferencias también aparecen por el poco control en la temperatura y las diferencias entre la composición de las unidades que componen el copolímero [30].

Los copolímeros tribloques en la forma $EO_n-PO_m-EO_n$, los valores de cmc están dentro del rango de 10^{-4} a 10^{-2} molar. Esta concentración se determina por los mismos métodos que se emplean para los tensoactivos convencionales, tales como mediciones de la tensión superficial, absorbancia y fluorescencia [27].

El proceso de micelización es direccionado por contribuciones tanto entálpicas como entrópicas. Donde los cambios de estas propiedades termodinámicas en la molécula deben ser considerados. Sin embargo es importante mencionar que las variaciones que dominan el proceso de micelización se deben a la autoasociación de las moléculas del agua. Las micelas se forman no por que las colas de los surfactantes se atraigan una a otra, sino porque la autoasociación del agua es favorecida ante cualquier tipo de asociación de otras moléculas que no puedan establecer un dipolo o interacciones de enlaces de hidrogeno [31].

El agua es forzada a formar enlaces con las colas de surfactante, haciendo que la tensión en los enlaces de hidrogeno sea alargada (entálpicamente desfavorable) y la configuración forzada del agua alrededor de la cola del surfactante (entrópicamente desfavorable). La micelización es un proceso

espontaneo. La energía libre de Gibbs de micelización (ΔG_m), la cual debería ser menor que cero para un proceso espontaneo se obtiene de la ecuación 2 [28].

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (2)$$

Dónde: ΔG_m es la variación de la energía libre de micelización de Gibbs, ΔH_m es la variación de la entalpía en el proceso de micelización y $T\Delta S_m$ es la temperatura por la variación de entropía en el proceso de micelización.

La contribución entálpica en esta ecuación no puede ser generalizada. Hay algunos sistemas donde los valores negativos de ΔH_m han sido detectados, sin embargo para otros sistemas se han reportado contribuciones tanto positivas como negativas. Lo anterior demuestra la importancia de la temperatura en la ΔH_m , lo cual proviene de la relación de Gibbs–Helmholtz, como un aspecto importante en el proceso de micelización, ecuación 3.

$$\left\{ \frac{\partial \left(\frac{\Delta G_m}{T} \right)}{\partial (T^{-1})} \right\}_p = \Delta H_m \quad (3)$$

Los valores para ΔH_m cambian de signo cuando cierta relación de temperatura final (T) es igual a temperatura inicial (T^*). Cuando $T < T^*$ la entalpia cambia $\Delta H_m > 0$ y la formación de micelas se torna como un proceso endotérmico [28].

Para sistemas acuosos a temperatura ambiente $T\Delta S_m$ es mayor que la contribución entálpica. Como ΔG_m es menor que cero y ΔH_m podría ser menor o mayor que cero, la variación de entropía ΔS_m debe tener un valor positivo.

Por lo tanto aunque a veces la micelización sea un proceso dirigido entálpicamente, en sistemas acuosos es dirigida entrópicamente. Valores positivos de ΔS_m indican un aumento en las configuraciones de los monómeros en una

micela. Estas micelas se presentan como estructuras con un bajo número de configuraciones por ende, de baja entropía. Entonces la entropía positiva de la micelización es dada por incremento en las configuraciones de las moléculas del solvente, incorporando las partes hidrofóbicas del surfactante en el interior de la micela, dejándolas afuera de la interacción con el solvente. Este proceso hace que moléculas del solvente que estaban presas interaccionando con los grupos hidrofóbicos del surfactante se liberen de esa interacción desfavorable, por lo tanto, les permite un mayor grado de libertad aumentando sus configuraciones al hacer parte otra vez del solvente y por ende aumentando la entropía del sistema. De la misma forma que las especies hidrofóbicas aumentan su número de configuraciones al interior de la micela, aumentando también la entropía [28]. Ambos efectos contribuyen a un valor positivo de ΔS_m .

Los bajos valores de ΔH_m implican que hay un aumento significativo en la entropía, que termina siendo una propiedad termodinámica que favorece la auto-organización del surfactante.

De esta forma se concluye que el proceso de micelización en un proceso espontaneo dirigido por una contribución entrópica y/o entálpica [28].

En este contexto, el desarrollo de un nuevo material que involucre nuevas tecnologías que contribuyan para la detección y cuantificación de forma rápida, fácil y segura de contaminantes ambientales y alimenticios, son el objetivo principal de este trabajo.

1.4 BENCENO Y SOLVENTES CLORADOS

La investigación a nivel ambiental ha ganado un enorme interés debido a las preocupaciones de seguridad pública, por la exposición de sustancias peligrosas al medio ambiente. Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) agrupan a una gran cantidad de sustancias químicas que se convierten fácilmente en vapores o gases y que pueden tener diferentes efectos nocivos para la salud, como un alto grado de toxicidad dependiendo del compuesto y el período de exposición al mismo, también poseen características como diferentes grados de

liposolubilidad, que les provee la capacidad de atravesar membranas biológicas siendo ampliamente distribuidos en organismos vivos. [32]

Compuestos como el benceno y solventes clorados son ampliamente usados, en la industria de forma rutinaria, tanto que, en muchos casos no es posible su sustitución. Sin embargo, se ha demostrado que muchos de ellos tienen efectos nocivos que se agravan por su capacidad de acumulación dentro del organismo.

A pesar de su baja concentración, tienen una gran peligrosidad debido a su persistencia en el medio y su capacidad de contaminar corrientes acuáticas naturales, Alimentos y ambientes gaseosos como el aire, introduciéndose en la cadena trófica de los seres vivos.

El benceno y los solventes clorados se utilizan en la industria química para la producción de diferentes compuestos derivados y no derivados, aunque su uso como disolventes se ha reducido en gran medida [32 - 33].

La biodegradación de estos compuestos en el suelo se hace sólo bajo condiciones aeróbicas con una vida media de unos pocos días a semanas y en aguas superficiales se volatilizan rápidamente para el aire [34].

Las fuentes potenciales de exposición a estos compuestos incluyen su uso industrial, los vapores de gasolina, tubo de escape del motor de vehículos de combustión interna, el humo del tabaco [32- 34].

El Benceno: se puede determinar por un procedimiento cromatográfico de gases y atrapamiento con detección de fotoionización, un método que es aplicable en un intervalo de concentración desde 0,02 hasta 1500 g / litro. La confirmación es por espectrometría de masas (límite de detección de 0,2 mg / litro) [34].

La tabla 1 muestra diferentes métodos entre los que sobresalen los cromatográficos, que se han desarrollado para analizar benceno y sus metabolitos en diferentes matrices [35].

Tabla 1. Los métodos cromatograficos para el análisis de benceno en diversas matrices

Matriz	Límite Detección	Método
Aire	0.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Cromatografía de Gases
	0.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Cromatografía de Gases acoplado detector ionización de llama
	1.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Cromatografía de Gases acoplado Espectrometría de Masas
	0.1 ppb	HeadSpace con Cromatografía de Gases acoplado Espectrometría de Masas
	0.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	HeadSpace con Cromatografía de Gases
Sangre	2.0 ng/cm^3	HeadSpace con Cromatografía de Gases acoplado Espectrometría de Masas
	1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	HeadSpace con Cromatografía de Gases
Orina	5.0 ng/dm^3	Cromatografía de Gases
	7.0 ng/dm^3	HeadSpace con Cromatografía de Gases
	0.31 ppb	HeadSpace con Cromatografía de Gases acoplado Espectrometría de Masas
Agua	0.1 g/dm^3	Cromatografía de Gases
	0.07 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$	HeadSpace con Cromatografía de Gases
Suelo	0.8 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$	Cromatografía de Gases
	2.0 ng	HeadSpace con Cromatografía de Gases
Varios: frutas leche aceite	10 ppm.	Cromatografía de Gases acoplado Espectrometría de Masas
	6.0 ng/cm^3	HeadSpace con Cromatografía de Gases

KhanH. A., CroaticaChemica Acta, 79, 2006, 169- 175. [35]

Solventes Clorados: Pueden estar presentes en el agua refinera como resultado de la cloración del agua, con los trihalometanos el principal de los subproductos de la desinfección. A altas temperaturas pueden someterse a la mineralización que resulta en la formación de cloruro, que puede causar la corrosión [61]. Un aspecto de interés creciente es la vigilancia de las aguas

superficiales y subterráneas potencialmente contaminadas por lixiviados de vertederos municipales, que se originan, generalmente, por la percolación de las aguas de lluvia, alcanzando los niveles subyacentes y las aguas subterráneas. Estos lixiviados pueden transportar compuestos como los solventes clorados (diclorometano, cloroformo y tetracloruro de carbono), siendo esta una de las principales fuentes de contaminación.

- **Diclorometano:** o cloruro de metileno, es un hidrocarburo líquido, incoloro y volátil, su toxicidad en humanos es de la forma de narcótico a altas concentraciones.
- **Cloroformo:** o triclorometano es un líquido volátil incoloro, no inflamable de sabor dulce y aroma característico, su toxicidad en humanos es de forma que la inhalación de dosis altas provoca hipotensión, paro respiratorio, cardiaco y muerte. Se usa como solvente y agente limpiador.
- **Tetracloruro de carbono:** o tetraclorometano es un líquido volátil e incoloro, no inflamable y de olor característico, su toxicidad en humanos radica en ser venenoso por inhalación, ingestión o adsorción por la piel, puede causar la muerte. En intoxicaciones crónicas causa daño hepático y renal. Es utilizado ampliamente como solvente en la industria química.

Máxima concentración permisible: Ya que casi toda la población mundial tiene acceso a la ingesta de agua potable y al aire que compone nuestra atmósfera es motivo de preocupación desarrollar sensores para la detección de estos contaminantes y saber si las concentraciones de exposición están dentro de los límites permisibles.

La máxima concentración permisible en el agua está definida por la siguiente fórmula [60].

$$\text{MCP} = (\text{DWEL})(\text{RSC})$$

Dónde:

MCP es la máxima concentración permisible.

DWEL (*drinking water effectlevel*) representa la concentración a la cual no se produce efecto adverso por la presencia de la sustancia en la matriz (agua).

RSC (*relativesourcecontribution*) es la contribución relativa de la fuente. En el caso del agua le corresponde el 20% lo que significa que de la contaminación total que se recibe del ambiente el 20% proviene del agua.

La concentración que no produce efecto adverso se obtiene por la siguiente formula [60].

$$\text{DWEL} = [(\text{RDF}) (70\text{Kg})] / (2\text{L})$$

Dónde:

RFD (*referencedose*) corresponde a la dosis de referencia.

70 Kg es el peso promedio de un individuo adulto.

2 L es la ingesta diaria de agua del individuo adulto.

Las máximas concentraciones permisibles de nuestros compuestos de interés se muestran en la tabla 2 [60].

Tabla 2. Máximas concentraciones permisibles de los compuestos de interés.

Compuesto	Concentración / (ng / mL)
Diclorometano	420
Cloroformo	7
Tetracloruro de carbono	5
Benceno	5

Las técnicas analíticas más utilizadas en la detección de diferentes compuestos organoclorados comprenden métodos cromatograficos utilizando detector de captura de electrones ya que la sensibilidad de este depende de la estructura del analito y es mayor para moléculas que contienen alógenos en su estructura. La alta sensibilidad de este detector permite límites de detección relativamente bajos obtenidos sin la necesidad de preconcentración del analito.

La tabla 3 muestra algunos valores de límites de detección de diferentes compuestos clorados [61].

Tabla 3. Límites de detección de solventes clorados de interés por CG-ECD

Compuesto	LD / $\mu\text{g L}^{-1}$
Diclorometano	0,6
Cloroformo	0,05
Tetracloruro de carbono	0,07

1.5 MELAMINA

Hoy en día, existen tecnologías que permiten a los organismos de salud detectar y responder después de haber ocurrido la contaminación. Sin embargo, hay una necesidad urgente de prevenir las contaminaciones de origen alimentario, causadas ya sea por contaminación accidental o intencional.

El interés aumenta hacia los diferentes eventos de adulteración de alimentos con melamina producidos a nivel internacional. En los años 2004 y 2007, se reportaron un gran número de casos de muertes por falla renal en perros y gatos en los Estados Unidos de América (EUA), asociado a la ingesta de comida de mascotas adulterada con melamina y ácido cianúrico que fueron deliberadamente adicionados en uno de los ingredientes [36], chocolates en Australia, pizzas en Taiwán y galletas con queso en Hungría.

La exposición de niños a fórmulas lácteas adulteradas con melamina y el incremento de casos de cálculos renales y falla renal en niños en China. El 13 de septiembre del 2008 se hace pública la adulteración de leche de lactantes por melamina, donde 400 niños fueron intoxicados temiendo por la vida de varios. De hecho un niño de la provincia noroccidental de Gansu falleció por cálculos renales. En pocos días se tenían nuevos datos y la cifra de bebés y niños intoxicados siguió aumentando como resultado del consumo de estos productos. Una semana después el ministerio de salud Chino reportó que alrededor de 40.000 niños recibieron tratamiento, de los cuales 12.900 estaban hospitalizados y se habían confirmado tres defunciones por esta causa [37]. Estas acciones generaron alertas a nivel mundial sobre la seguridad alimentaria, particularmente en el monitoreo y

control de estos productos lácteos para consumo infantil [36]. El evento de contaminación de fórmulas lácteas reveló que melamina sola, puede causar toxicidad cuando es ingerida en grandes dosis, dosis mayores a las reportadas por algunos estudios preliminares con animales, probablemente porque la melamina combinada con los uratos endógenos conlleva a la formación de cálculos renales, observando proporciones más elevadas de presencia de dichos cálculos en neonatos y lactantes menores de seis meses de edad, que disminuían gradualmente en los lactantes hasta los 36 meses.

La adulteración de los alimentos constituye una práctica fraudulenta y tiene fines económicos al alcanzar productos más baratos. Se considera adulterado un alimento cuando su naturaleza o composición no correspondan a la información mostrada en la etiqueta [37]. Los fraudes en materias primas como en productos alimenticios terminados han aumentado considerablemente en los últimos años y no sólo se manifiesta en los países pobres sino también en los desarrollados. Las adulteraciones cada día son más difíciles de detectar ya que las sustancias implicadas presentan una composición muy similar a la del producto de origen, de ahí la necesidad de contar con métodos más selectivos y específicos para poder detectar los adulterantes.

El fraude con melamina radica en que por ejemplo el Método Kjeldahl es un proceso de análisis químico para determinar el contenido en nitrógeno de una sustancia química y se engloba en la categoría de medios por digestión húmeda se usa comúnmente para estimar el contenido de proteínas de los alimentos. Donde el principal inconveniente de este método es en la posible valoración de nitrógeno no proteico, e incluso de sustancias tóxicas y sin ningún valor nutritivo, como la melamina que el 66 % de su peso en masa es producto de sus átomos de nitrógeno.

La melamina fue sintetizada por primera vez por el químico alemán Justus Von Liebig en 1834. Es considerada según ROCHA & MACÊDO (2009), uno de los 14 grandes villanos de la contaminación química. Se trata de un compuesto orgánico, cuyo nombre oficial es 1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine (Figura 8). Es un polvo blanco cristalino y esparcialmente soluble en agua (3.1 g/L a 20°C).

Su fórmula estructural y molecular es:

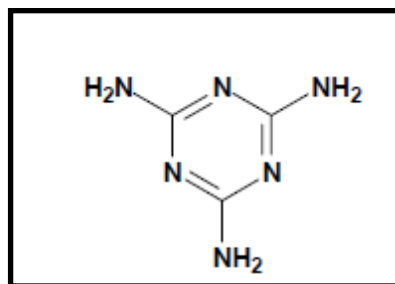


Figura 8. Estructura de la melamina.

Numero CAS: 108-78-1 Tomado de: IARC, 2012 [38]

Inicialmente la producción de melamina ocurre cuando la cianamida de calcio es convertida en una dicianidiamida y esta es calentada por encima del punto de fusión, sin embargo en la actualidad se emplea la urea para la producción de melamina. Este último proceso ocurre en dos pasos, una primera reacción endotérmica donde la urea se descompone para formar el ácido cianúrico (HCNO) más amoníaco. En la segunda etapa ocurre la polimerización del ácido cianúrico para formar la melamina y la liberación de dióxido de carbono, este proceso es exotérmico.

Durante la síntesis química pueden ocurrir diferentes productos intermedios como son ácido cianúrico, ammelina y ammelida (Figura 9), estos metabolitos también puede aparecer por la degradación microbiológica de la melamina [39].

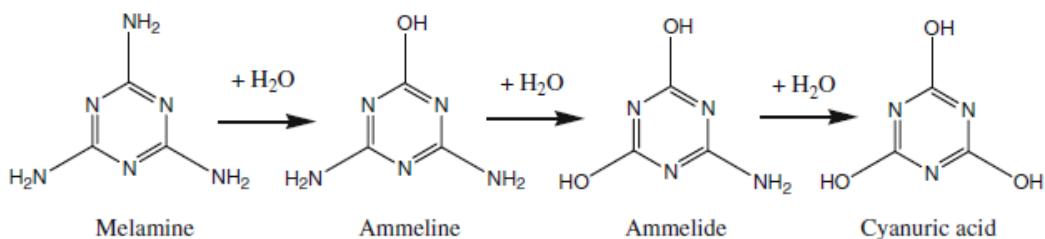


Figura 9. Estructuras químicas de la melamina y sus metabolitos.

La combinación de la melamina con el ácido cianúrico forma el cianurato de melamina, también conocido como ácido cianúrico de melamina o complejo ácido de melamina ácido cianúrico, la unión de estos dos compuestos ocurre a través de enlace de hidrógeno (Figura 10) [40].

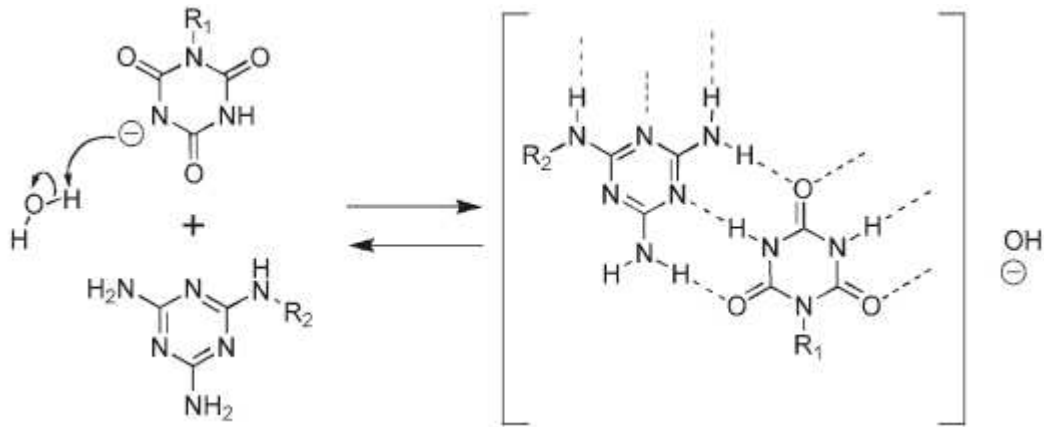


Figura 10. Estructura química del cianurato de melamina [40].

Un resumen sobre las características físico químicas de las cuatro estructuras antes citadas se muestra en la tabla 4.

Metabolismo y toxicidad de la melamina

La melamina no es metabolizada por los animales y es excretada en más del 90% en la orina dentro de las 24 horas. Estudios realizados en animales muestran que la melamina tiene un rango de vida media entre 2.7 y 4.04 h cuando es administrada por vía oral o endovenosa [40]. Un estudio farmacocinético de una aplicación intravenosa de la melamina (6.13 mg kg^{-1}) en puercos destetados mostró un aclaramiento de $0.11 \pm 0.01 \text{ L / h / kg}$ y un volumen de distribución de $0.61 \pm 0.04 \text{ L kg}^{-1}$, mientras en el modelo de rata el valor de la vida media de la melamina fue 1.5 veces menor y el volumen de distribución 3 veces mayor, estas diferencias se atribuyen a la velocidad de filtración glomerular [41].

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de la melamina y metabolitos.

	Melamina	Ácido cianúrico	Ammelida	Ammelina
Sinónimos	Melamina, 8Cl, 2,4,6-Triamino- striazina, Cianuramida, Cianurotriamida,2 ,4, 6-Triamino-1,3,5- striazina, Virset 656-4	1,3,5-Triazina- 2,4,6(1H,3H,5H) - trione, 9Cl- Triazina- 2,4,6-triol, 8Cl ácido isocianúrico Trihidroxicianidi na	Ammelida, Acido melanúrico ácido cianúrico monoamida, 6- Amino-1,3,5- striazina- 2,4(1H,3H)-dione, 9Cl	4,6-Diamino- 1,3,5- striazina-2(1H)- one, 9Cl, ,6-Diamino- striazina- 2-ol, 8Cl, ácido cianúrico diamida, Ammelina
Fórmula molecular	$C_3H_6N_6$	$C_3H_3N_3O_3$	$C_3H_4N_4O_2$	$C_3H_5N_5O$
Peso molecular	126.121	129.075	128.09	127.105
Porcentaje de composición %°C	C 28.57; H 4.79; N 66.63	C 27.92; H 2.34; N 32.55; O 37.19	C 28.13; H 3.15; N 43.74; O 24.98	C 28.35; H 3.96; N 55.10; O 12.59
Descripción física	Cristales	Cristales blanco. + 2H ₂ O	Cristales blanco (H ₂ O)	Cristales (Na ₂ CO ₃ aq.)
Punto de fusión	347	360		
Solubilidad	Parcialmente hidrosoluble; ligeramente soluble en etanol. Insoluble. Et ₂ O, C ₆ H ₆ , CCl ₄	Soluble en etanol caliente Parcialmente hidrosoluble		
Constante de disociación	pK _a 5,35 (25°C, H ₂ O)	pK _a 4.74 (25°C, H ₂ O)		

Tomado de: Hau AK, Kwan TH, Li PK. J Am Soc. Nephrol, 20 (2), 2009, 245 [40].

Usos de la Melamina

La melamina es una sustancia química sintética con una variedad de usos industriales, incluyendo la producción de espumas, productos de limpieza, fertilizantes y plaguicidas, pero no se encuentra de manera natural en los alimentos. Es utilizada también en el curado de la resina en la elaboración de los materiales usados para empacar alimentos como plásticos, papel, cartón, adhesivos, empaques, recubrimientos de plástico, utensilios de cocina, revestimientos de protección utilizados en el interior de latas metálicas de comida, entre otros [42].

Puede estar presente en los alimentos como metabolitos y/o productos de degradación de ciromazina, cuando es utilizada como producto fitosanitario (insecticida y acaricida), medicamento veterinario (control de ectoparásitos) y retardante de llamas. Dependiendo del proceso de purificación, la melamina puede contener distintos niveles de sustancias estructuralmente relacionadas con el ácido cianúrico, amelina y amelida [42].

Según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es aprobado el uso de la melamina como monómero y como aditivo en plásticos y tiene un límite de migración específico (LME) de $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de alimento [42]. En cuanto a la FDA, la melamina se encuentra en la lista de aditivos utilizados en la fabricación de empaques [43].

Migración al Alimento

La melamina se puede presentar en el alimento por dos vías: a) en una concentración base, debido a la utilización de materiales que contienen esta sustancia, y b) por adulteración del producto o por el uso no autorizado de sustancias (como el plaguicida ciromazina o de fertilizantes,) que se pueden degradar [44].

En un estudio realizado por Lund y Petersen (2006), a muestras que estuvieron en contacto con una solución de ácido acético al 3% durante 2 horas a 70°C , se detectó migración de la melamina de 0,28 hasta $0,45 \text{ mg dm}^{-2}$, en tres de las 19 muestras. [45].

Análisis Químicos

Varios métodos han sido desarrollados para los análisis de melamina en diferentes sustratos. Estos incluyen cromatografía gaseosa (GC), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC en sus siglas en ingles); CG o HPLC acoplada a un espectrómetro de masa, electroforesis capilar e inmunoensayos entre otros.

Un análisis de las diferentes técnicas y principales procedimientos se refleja a continuación:

HPLC-MS/MS. Es el método más seguro para la cuantificación de melamina en diferentes matrices en el orden de las partes por billón (ppb) por su alta sensibilidad y selectividad en una amplia variedad de productos. Las muestras son extraídas con una mezcla de acetonitrilo:agua, el extracto es purificado por extracción líquido-líquido seguido por extracción en fase sólida. El uso de estándares internos marcados isotópicamente permite la cuantificación confiable a niveles bajos. La instrumentación requerida es de alta tecnología y costosa [47].

HPLC-MS. En muchos casos sus resultados de selectividad y límite de cuantificación son comparables con el HPLC-MS/MS, su principal limitación está en la valoración de la muestra por las interferencias que pueden coincidir con la masa molecular protonada de la melamina. Se requiere de una limpieza eficiente empleando columna de intercambio catiónico. El procedimiento permitiría una cuantificación confiable y al igual que el procedimiento anterior la instrumentación requerida es de alta tecnología [47].

CG-MS. Las muestras son extraídas con una mezcla de acetonitrilo agua dietilamina y requieren de una mayor purificación para su posterior derivatización. El método una vez desarrollado presenta alta selectividad y sensibilidad, pudiendo ser aplicado a una amplia variedad de matrices. El método original propuesto por la FDA de Estados Unidos alcanzó un límite de cuantificación de 2 mg kg^{-1} , sin embargo puede determinar hasta 0.01 mgkg^{-1} . El sistema CG-MS requiere mayor atención cuando se trabaja con muestras derivatizadas. Los controles de calidad son más estrictos debido a una mayor probabilidad de error por la manipulación de

la muestra en su preparación. La instrumentación requerida es de alta tecnología y costosa.

HPLC-UV. Puede proporcionar una información cuantitativa (generalmente emplea UV 240 nm). Las muestras son extraídas con una mezcla de acetonitrilo y agua empleando un sistema de par iónico en sus análisis. Muestras complejas como galletas y golosinas presentan una variedad de interferencias que absorben a la longitud de onda de 240 nm. Por lo general las muestras positivas requieren de un segundo método para su confirmación y cuantificación. Requiere de tecnología pero no tan costosa como la anterior [47], otro inconveniente de este método es que no se pueden detectar compuestos relacionados a la melamina, como ácido cianúrico, ammelina y ammelida debido a la baja absorbancia en UV. Estos últimos compuestos son de gran importancia en la industria alimenticia, dado que su presencia es consecuencia de la hidrólisis de melamina que pudiera ocurrir durante las diferentes etapas del proceso y/o manufactura de los alimentos. Además, otro punto a considerar, es que la melamina desarrolla su toxicidad en combinación con ácido cianúrico, debido a los cálculos renales formados de un complejo insoluble de cianurato de melamina, que resultan fatales”, agregó el Dr. Mitterer.

ELISA. Son métodos de alta especificidad por su principio de reacción antígeno anticuerpo. Son ensayos cuantitativos y se emplean fundamentalmente en las matrices de leche fluida y en polvo, gluten de trigo y comida de mascota. Las muestras no requieren de purificación para ser analizadas. Los juegos de reactivos están disponibles comercialmente y constituye una herramienta de pesquiasaje adecuado. En ocasiones no se alcanzan los límites de detección requeridos para algún tipo de matriz [16]. Probablemente, las pruebas de elisa, son la mejor alternativa para las empresas lácteas, que no tienen acceso a un laboratorio sofisticado. Utilizando una prueba de elisa con 96 pocillos, el costo por análisis resulta muy económico, y la inversión en un lector de pocillos, necesario para medir la densidad óptica y, subsecuentemente, cuantificar el contenido de melamina, resulta inferior a 10.000 euros, dependiendo del modelo. Según Limien Tan, directora de ventas para RomerLabs Singapur, “Este método es el de

elección para, especialmente, las empresas lácteas ubicadas en áreas remotas, pero incluso las grandes corporaciones multinacionales e instituciones gubernamentales con muchos laboratorios locales han optado por el mismo. La principal ventaja de la prueba elisaAgraQuant para melamina es que los analistas pueden completar su entrenamiento y comenzar a utilizar el análisis en forma rutinaria en menos de un día, especialmente cuando el protocolo detiene la liberación del producto.

En la tabla 5, se muestran un resumen de los diferentes procedimientos para la determinación de melamina y compuestos análogos en distintos sustratos.

Tabla 5. Metodologías analíticas desarrolladas para la determinación de melamina y compuestos análogos.

Compuestos	Sustrato	Sistema	Purificación	Ref.
Melamina Amelina, Amelida y ácido Cianúrico	Harina de cereales	HPLC-UV (220)	Partición y centrifugación	[47]
Melamina	Plasma			[48]
Melamina Cyromazina	Leche			[49]
Melamina	Bebidas			[50]
Melamina Ácido Cianúrico		HPLC-MS (ESI)		[51]
Melamina Amelina, Amelida y ácido Cianúrico	Gluten de trigo, proteína de arroz, gluten de maíz y proteína de soja	CG-MS	Extracción sólido líquido	[52]
Melamina Ácido cianúrico	Productos lácteos		La muestra es sonicada, centrifugada y derivatizada	[53]
Melamina	Músculo	HPLC-MSMS (ESI)	Extracción de fase sólida (SPE)	[54]
Melamina	Riñón		Partición y centrifugación	[55]
	Alimentos		Extracción líquido/líquido y SPE	
Melamina Ácido cianúrico	Alimentos para Mascotas		No requiere purificación. Extracción, Sindicación y filtración por filtro de 0.2µm	[56]
Melamina Ácido cianúrico	Fórmula láctea		Doble extracción líquido-líquido	[57]
Melamina Ácido cianúrico	Fórmula láctea y tejidos	Extracción líquido-líquido SPE (MEL:MCX SPE)	[58] [49]	
Melamina	Gluten, alimento húmedo y seco y leche	ELISA	Extracción con PBS	[59]

La contaminación por melamina es un verdadero problema global, que involucra a pequeñas y grandes empresas lácteas, desde China hasta Ecuador. Las industrias y los gobiernos están implementando medidas para que alimentos contaminados con melamina en todo el mundo no suceda nuevamente. Si bien los sistemas para el aseguramiento y el control de la calidad son importantes, son las herramientas analíticas disponibles las que juegan un papel fundamental en la recuperación de la confianza de los consumidores y hacen más seguro a los alimentos a nivel global.

La propuesta principal en este trabajo, es la detección de Benceno, solventes clorados y de Melamina como moléculas de interés ambiental y alimenticio. Por medio de un nanosensor óptico a base PDAs / copolímero tribloque, usando la técnica de absorción molecular Ultravioleta (UV-vis) como medio de cuantificación.

CAPITULO 2

2.1 OBJETIVOS

- Desarrollar nuevas nanoestructuras de polidiacetileno que puedan ser aplicadas como nanosensores para la detección de Benceno, solventes orgánicos clorados y melamina.
- Investigar el efecto de la estructura química y del balance hidrofóbico e hidrofílico de los copolímeros tribloques en la respuesta colorimétrica (RC) de las nanoblendas PCDA / copolímero tribloco y TCDA / copolímero tribloco.
- Determinar el efecto de la estructura química de compuestos clorados sobre la transición colorimétrica de las nanoblendas de PCDA/L64.
- Analisar el efecto del pH en la interacción intermolecular de lamelamina con las nanoblendas de PCDA / copolimerotribloque.
- Determinar la contribución relativa de las diferentes interacciones intermoleculares para la transición colorimétrica de las nanoblendas PCDA/copolímero tribloque causada por interacción con moléculas de melamina.

2.2 METODO EXPERIMENTAL

2.2.1 Síntesis de vesículas

0,0148 gramos (g) de monómeros de 10,12- ácido pentacosadiynoico (PCDA), SIGMA – ALDRICH, lote BCBDO195V, pureza $\geq 97\%$ grado HPLC. Se disolvieron en 40 mililitros (mL) de cloroformo (CHCl_3), que se separó después por una corriente gaseosa de nitrógeno (N_2). Se añadió 40 mL de agua desionizada para hacer que la concentración de PCDA total sea de 1 milimolar (mmol L^{-1}). La suspensión resultante se solubilizó utilizando un ultrasonido de puntera, SONICS & MATERIALS INC. Modelo VC750, puntera 630-0435 de 5,0 a 10 mL, proceso que se lleva a cabo por 10 minutos (min), obteniendo una solución blancuzca turbia. Para obtener una solución clara, se filtró inmediatamente con un filtro de (PVDF) de 0,45 micras (Millipore). La solución resultante se almacenó a 4°C durante 8 horas para promover la orientación de los monómeros de PCDA. La fotopolimerización de los monómeros que es considerado como un proceso donde moléculas fotocromáticas experimentan una reacción de adición en sus enlaces covalentes en presencia de radiación, se lleva a cabo por la exposición a la radiación ultravioleta (UV) a 254 nm durante 20 minutos, resultando en vesículas de PCDA azules.

2.2.2 Síntesis de nanoblendas

Previamente se pesa 1,0 g de copolímero tribloco, se diluye en 100 mL de agua desionizada Obteniendo la concentración de copolímero deseada en % (m/m). De esta misma forma se prepararon soluciones de diferentes copolímeros (tabla 6), en concentraciones que van desde 0,10 hasta 5,0 % (m/m).

0,0148 g de monómeros de PCDA, SIGMA – ALDRICH, lote BCBDO195V, pureza $\geq 97\%$ HPLC. Se disolvieron en 40 mL de solución de copolímero, para hacer que la concentración de PCDA total sea de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tabla 6. Estructura química y composición de copolímeros tribloques.

Copolímeros	EO (n)	PO (m)	PM / (g.mol ⁻¹)
L64	2 x 13	31	2900
P123	2 x 19	69	5800
F68	2 x 76	30	8400
F127	2 x 95	64	12000

La suspensión resultante se solubilizó utilizando un ultrasonido de puntera, SONICS & MATERIALS INC. Modelo VC750, puntera 630-0435 de 5,0 a 10 mL, proceso que se lleva a cabo por 8 min. Obteniendo una solución turbia. Se filtró inmediatamente con un filtro de (PVDF) de 0,45 micras (Millipore). La solución resultante clara, se almacenó a 4°C durante 8 horas para promover la orientación de los monómeros de PCDA. La fotopolimerización de los monómeros se lleva a cabo por la exposición a la radiación ultravioleta (UV) 254 nm durante 10 min, resultando en nanoblendas de PCDA azules.

2.2.3 RC de vesículas de PCDA y nanoblendas de PCDA/copolímero tribloque en presencia de diferentes analitos

Se prepara un número específico de tubos de ensayo que contienen una cantidad determinada de solución de vesícula de PCDA o nanoblendas de PCDA/copolímero tribloque en concentraciones de; 0 (vesícula clásica); 0,10; 0,50; 1,0; 2,0; 5,0 % (m/m), estos son diluidos con agua en el caso de las vesículas o con solución acuosa de copolímero que se encuentra en la misma concentración que fue preparada la nanoblenda. Son añadidas diferentes cantidades de benceno, MERCK, lote 30208, pureza 99,5%. Que van desde 0 hasta 12,0 µL. Obteniendo concentraciones desde 0 hasta 0,03721 mol L⁻¹. Esta mezcla es agitada por 30 seg. Utilizando un agitador vortex, B. BRAUN BIOTECH, tipo certomat MV 541-19000-27-1. Luego la solución resultante es colocada en un baño termostático CIENTEC CT-282, a 25°C por un tiempo determinado hasta apreciar un cambio de color.

Los espectros se obtuvieron utilizando un Shimadzu UV-2550 espectrómetro dependiendo de la temperatura de transición del copolímero, teniendo en cuenta que la mayoría fueron a 25°C en el intervalo de 350-900 nm.

El cálculo de la RC se hace según lo mencionado en el procedimiento de la ecuación 1.

Este procedimiento se repitió en las mismas condiciones para soluciones de bencenos substituidos como; Fenol SIGMA-ALDRICH, lote 12227PH048, pureza 99%; Clorofenol ALDRICH, lote 05924LC484, pureza 99%; Orto kresol ALDRICH, lote 07030PH-068, pureza 99%. De igual manera para solventes clorados (cloroformo, diclorometano y tetracloruro de carbono) y melamina.

2.2.4 Estudio del pH en la RC de nanoblendas de PCDA/L64 en presencia de melamina

Una cantidad previamente calculada de solución de nanoblendas en L64 1,0 % (m/m), es sometida a un ajuste de pH a 4 con HCl, utilizando un pHmetro, METRON – 827. Una vez ajustado el pH, se continúa con el procedimiento descrito en la sección anterior.

De igual forma se hace un ajuste de pH a 7 con NaOH, utilizando un pHmetro, METRON – 827. Una vez ajustado el pH, se continúa con el procedimiento descrito para el cálculo de la RC.

2.2.5 RC de Nanoblendas de monómeros de TCDA Sintetizadas en L64 1,0% (m/m) en presencia de melamina

Para sintetizar las nanoblendas de TCDA se toman; 0,0138 g de monómeros de TCDA, SIGMA – ALDRICH, lote BCBF1132V, pureza $\geq 98\%$ grado CG. Se disolvieron en una cantidad definida de solución de L64 1,0% (m/m) previamente preparada, calculando que la concentración de TCDA total sea de 1,0 mmol L⁻¹. La suspensión resultante se solubilizó utilizando un ultrasonido de puntera, SONICS & MATERIALS INC. Modelo VC750, puntera 630-0435 de 5,0 a 10 mL, proceso que se lleva a cabo por 6 min. Obteniendo una solución turbia.

Esta se filtró inmediatamente con un filtro de (PVDF) de 0,45 micras (Millipore). La solución resultante clara, se almacenó a 4°C durante 8 horas para promover la orientación de los monómeros de TCDA. La fotopolimerización de los monómeros se lleva a cabo por la exposición a la radiación UV 254 nm durante 5,0 min, resultando en nanoblendas de TCDA/L64 azules.

La RC para las nanoblendas de PCDA y TCDA es calculada de igual forma siguiendo el procedimiento descrito para la ecuación 1.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Espectro UV-vis de las Vesículas y Nanoblendas

La figura 11 muestra el espectro electrónico en la región ultravioleta-visible (UV-vis) de las vesículas de PCDA (a) y de las nanoblendas de PCDA sintetizadas en solución acuosa de L64 (PCDA/L64) (b) para las formas rojas y azules.

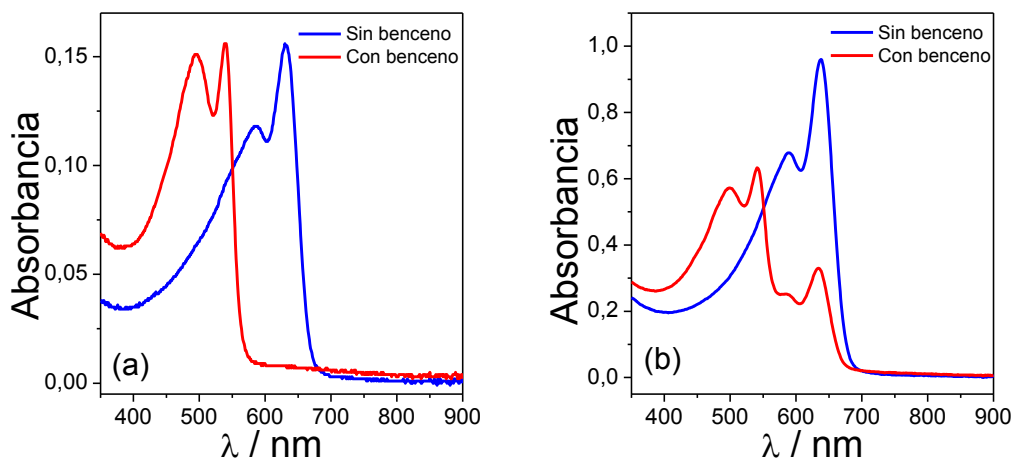


Figura 11. Espectro de absorción molecular de vesículas de PCDA sin benceno y con benceno (a) y espectro de absorción molecular de nanoblendas de PCDA/L64 sin benceno y con benceno (b).

Para ambas nanoestructuras el espectro electrónico de la forma azul es formado por una banda larga con un máximo en 640 nm y un hombro de menor intensidad 590 nm. Por consiguiente la forma roja el espectro UV-vis es formado por dos bandas que se superponen generando dos máximos en 540 y en 490 nm, respectivamente. Estas transiciones electrónicas se originan entre orbitales π resonantes ligantes y antiligantes presentes en ligaciones dobles alternadas existentes a lo largo de la cadena polimérica de PCDA. La transición de la forma azul para la forma roja se debe a una reducción de la longitud en las distancias disponibles para que los electrones π se puedan trasladar. Esta reducción de la longitud ocurre debido a la rotación de enlaces simples carbono-carbono presente en la cadena polimérica de PCDA. De esta forma podemos concluir que la longitud de las moléculas de PCDA en la nanoblenda es el mismo que en las vesículas.

Sin embargo aunque las nanoblendas contienen la misma concentración de monómeros de diacetileno que la concentración presente en la vesícula, la absorbancia es mayor en las nanoblendas. Esta mayor intensidad de luz absorbida es debido a un mayor rendimiento de la reacción de polimerización de los monómeros de diacetileno en la nanoblenda que en la vesícula. Posiblemente esa mayor eficiencia en el proceso de polimerización de los monómeros de diacetileno cuando se mezclan con el copolímero L64 es causado por un mejor empacamiento y orientación de los monómeros de diacetileno, ya que el aumento de regiones hidrofóbicas en el sistema permite interacciones más favorables para los monómeros de PCDA.

El efecto de la concentración de L64 en la síntesis de las nanoblendas de PCDA fue evaluado. La figura 12 muestra el espectro de las nanoblendas de PCDA formadas en diferentes concentraciones de copolímero L64 0,10; 0,50; 1,0; 2,0 y 5,0 % (m/m) con igual concentración de monómeros de PCDA.

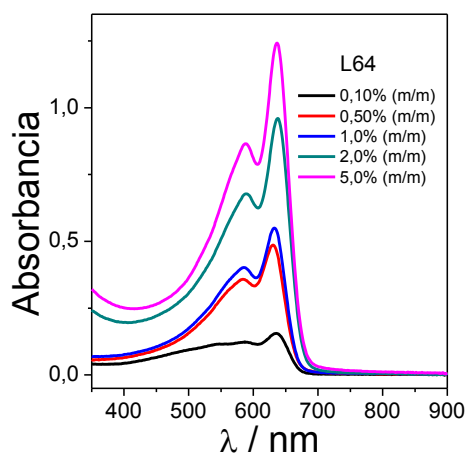


Figura 12. Espectro de absorción molecular de nanoblendas de PCDA/L64 a diferentes concentraciones de L64.

Se observa que el aumento de concentración de copolímero L64 en el intervalo de 0,10 a 5,0 % (m/m) causa un aumento en la absorbancia de la banda asociada a la transición electrónica de la forma azul. La figura 13 muestra la dependencia de la absorbancia en función de la concentración de copolímero tribloque a una longitud de onda de 640 nm.

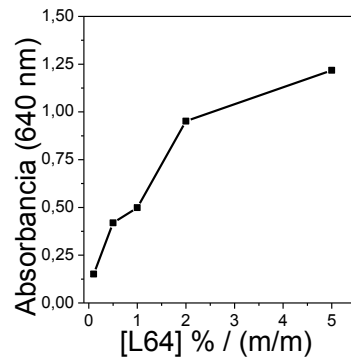


Figura 13. Curva de la absorbancia a 640 nm de nanoblendas de PCDA/L64 en función de la concentración de L64.

El aumento en la concentración de polímero torna más eficiente la reacción de polimerización de los monómeros de diacetileno. El estado de agregación de las moléculas de L64 en solución acuosa depende de la concentración y de la temperatura del sistema. Moléculas de copolímero tribloque tienden a agregarse formando micelas macromoleculares formadas por un núcleo hidrofóbico y por una corona hidrofílica, (figura 14).

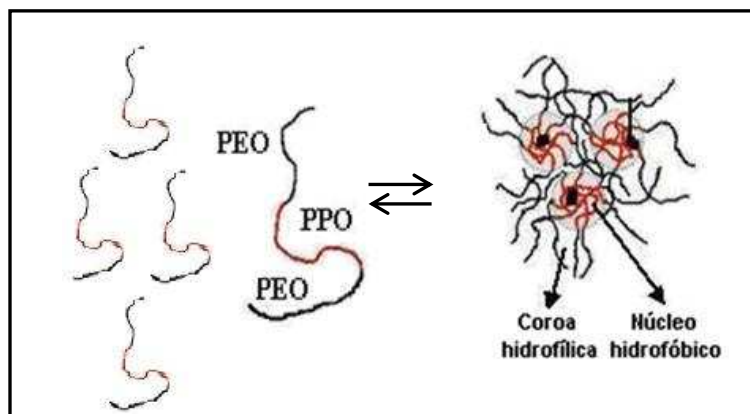


Figura 14. Agregados macromoleculares formados por monómeros de copolímero tribloque.

De esta forma, en la concentración de 0,10% (m/m) de L64 la solución acuosa es formada por macromoléculas de L64 dispersas formando pequeñas regiones hidrofóbicas formadas por monómeros de polipropileno. Con el aumento en la concentración de L64 aproximadamente 2,5 % (m/m) a 20°C [27] ocurre la agregación de esas macromoléculas creando núcleos hidrofóbicos mayores de que los anteriores por ser formados por monómeros de polipropileno viniendo de diferentes macromoléculas. Por ser mayores estos nanoreactores solubilizan un

mayor número de monómeros de diacetileno causando consecuentemente un mayor rendimiento en el proceso de fotopolimerización.

Para verificar el efecto de la estructura del copolímero tribloque sobre el proceso de polimerización fueron sintetizadas nanoblendas con diferentes nanoestructuras hidrofóbicas e hidrofílicas. Los copolímeros tribloques pueden ser genéricamente representados por la formula $(EO)_n-(PO)_m-(EO)_n$. Donde n representa el número de monómeros de óxido de etileno presentes en el bloque hidrofílico de la macromolécula en cambio m expresa el número de monómeros de óxido de propileno existentes en la parte hidrofóbica de la macromolécula. Modificando la proporción entre m y n podemos generar nanoestructuras con diferentes balances hidrofóbicos/hidrofílicos pues generan nanoagregados con núcleos hidrofóbicos de diferentes tamaños así como regiones hidrofílicas espacialmente distintas. La tabla 1 presenta la estructura química de los copolímeros usados en este trabajo para la síntesis de las nanoblendas copolímero/PCDA.

La figura 15 muestra el efecto de la estructura del copolímero tribloque sobre el espectro electrónico de las moléculas de PCDA nanoestructuradas en las nanoblendas. La concentración de todos los copolímeros fue igual a 1,0 % (m/m).

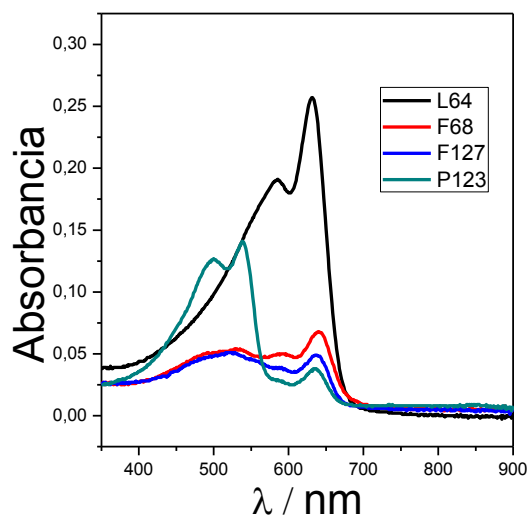


Figura 15. Espectros electrónicos de nanoblendas de PCDA en diferentes copolímeros tribloque a concentración 1,0 % (m/m).

La absorbancia fue mayor en las nanoblendas formadas por L64 donde las macromoléculas poseen 31 monómeros hidrofóbicos de (PO) y 2 bloques que contienen 13 monómeros hidrofílicos de (EO). Esta Nanoestructura optimiza la reacción de polimerización aportando absorbancias mayores. Por consiguiente cuando aumentamos la región hidrofóbica (P123 = 69 unidades PO y F127 = 64 unidades PO), o cuando aumentamos la región hidrofílica la eficiencia de la reacción de polimerización es disminuida, pues la absorbancia de las nanoestructuras formadas disminuye, esto puede ser explicado por el balance entre la masa molar relativa y el número de monómeros hidrofóbicos presentes en la molécula con respecto al número de unidades hidrofílicas en la misma, ese balance puede llevar a un comportamiento donde las interacciones entre los monómeros de PCDA sean más favorables por el pequeño impedimento que generan las pocas unidades EO, comparada con copolímeros donde sus unidades EO son mucho mayores con respecto a su masa molar relativa. Después de conocer el comportamiento óptico de estas nanoestructuras fueron exploradas las potencialidades de su aplicación para el desenvolvimiento de nanosensores ópticos para la determinación de diferentes analitos.

3.2 Nanosensor para la determinación de Benceno

Para determinar el potencial del uso de estas nanoestructuras, para la determinación de benceno es necesario el cálculo del porcentaje de las moléculas de polidiacetileno que sufren transición de color azul para rojo, ósea la respuesta colorimétrica (RC). Donde esta fracción de moléculas puede ser calculada por la ecuación 1.

La figura 16 representa la respuesta colorimétrica de nanoestructuras de PCDA en la forma de vesícula o en la forma de nanoblendas formadas entre moléculas de PCDA y copolímero tribloque L64.

Casi un 100 % de las moléculas de polidiacetileno permanecen de color azul para las vesículas de PCDA hasta alcanzar concentraciones de benceno mayores a $50,0\text{mmol L}^{-1}$.

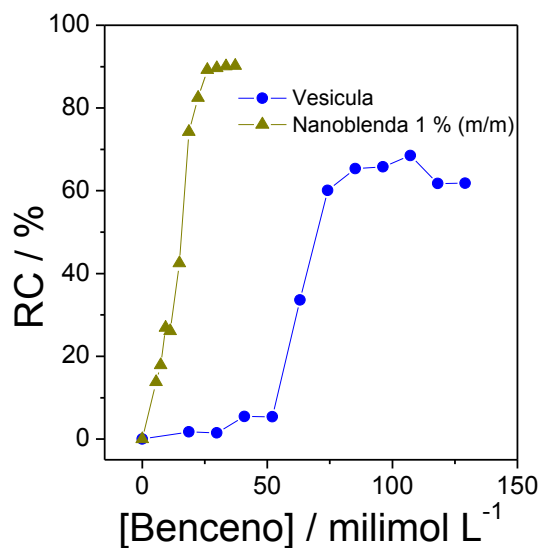


Figura 16. Respuesta colorimétrica de nanoestructuras tipo vesícula o nanoblendas en función de la concentración de benceno.

Para concentraciones de benceno por encima de 50 mmol L⁻¹ ocurre una transición abrupta en la cual aproximadamente 70% de las moléculas de polidiacetileno se convierten de la forma azul para la forma roja. Para las nanoblendas PCDA/L64 la transición ocurre de una forma abrupta en concentraciones menores de 20 mmol L⁻¹ llevando a más del 90% de las moléculas a cambiar de color azul para rojo.

La figura 17 muestra la fotografía de la dispersión de estas vesículas conteniendo 0 mmol L⁻¹ de benceno y 105 mmol L⁻¹ de benceno.

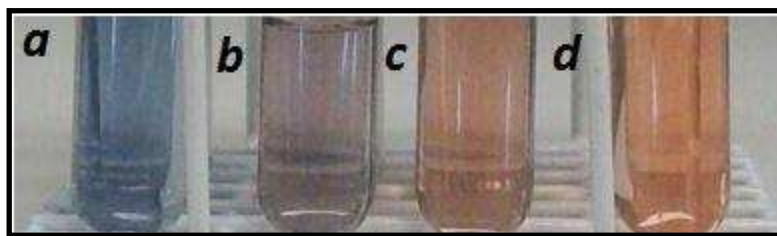


Figura 17. Fotografía de la dispersión de vesículas con adición de (a) 0 mmol L⁻¹, (b) 60 mmol L⁻¹, (c) 80 mmol L⁻¹, (d) 105 mmol L⁻¹ de benceno.

La figura 18 muestra los colores de sistemas conteniendo 0 mmol L⁻¹ y 15 mmol L⁻¹ de benceno.

Para inducir de la transición colorimétrica de las dos nanoestructuras es necesario que las moléculas de benceno interaccionen con las moléculas de PCDA presentes en los diferentes agregados.

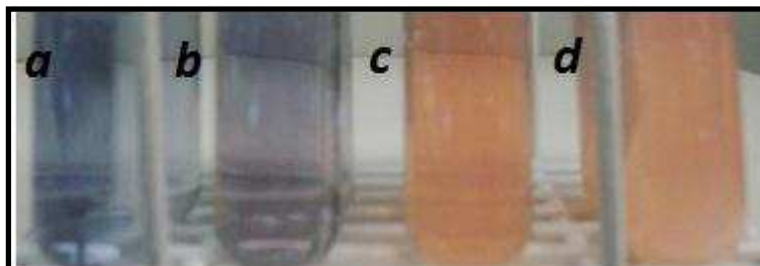


Figura 18. Fotografía de la dispersión de las nanoblendas con adición de (a) 0 mmol L^{-1} , (b) 5 mmol L^{-1} , (c) 10 mmol L^{-1} , (d) 15 mmol L^{-1} de benceno.

El benceno por su baja solubilidad con las moléculas de agua prefiere así concentrarse en regiones hidrofóbicas del sistema. Ambas nanoestructuras poseen núcleos hidrofóbicos. Por lo tanto la composición de esos núcleos difiere en las dos nanoestructuras. En la vesícula el núcleo hidrofóbico es formado apenas por monómeros de diacetileno, en cambio en las nanoblendas el núcleo hidrofóbico es compuesto por la mezcla de monómeros de diacetileno y de óxido de propileno. De esta forma los resultados de la transición colorimétrica demuestran una mejor solubilidad del benceno en el interior de las nanoblendas posiblemente por una mejor interacción entre este compuesto orgánico y los monómeros de óxido de propileno. Esta interacción intermolecular entre benceno y óxidos de propileno alteran la interacción entre oxido de propileno y PCDA reduciendo así la barrera rotacional de los enlaces carbono-carbono de las moléculas de PCDA permitiendo así el cambio de coloración de azul para rojo.

Para determinar la influencia de la interacción benceno-óxido de propileno en la transición colorimétrica, fue estudiada la respuesta colorimétrica de nanosensores sintetizados con diferentes concentraciones de copolímero tribloque. La figura 19 representa la respuesta colorimétrica de las nanoblendas en función de la concentración de benceno.

Este grafico representa la respuesta colorimétrica de diferentes tipos de nanoblendas de PCDA que fueron sintetizadas en diferentes concentraciones de

copolímero tribloque L64, en función de la concentración de benceno. Con el aumento de la concentración de copolímero tribloque ocurre una disminución en la cantidad necesaria de benceno para inducir la máxima transición colorimétrica en las diferentes nanosensores. Esto ocurre probablemente porque con el aumento en la concentración de L64 ocurre un aumento de regiones hidrofóbicas en el sistema con consecuencia del aumento en la solubilización de benceno en estas nanoregiones hidrofóbicas. Por lo tanto con el aumento de la concentración de benceno en el interior de las nanoblendas es inducida la transición colorimétrica.

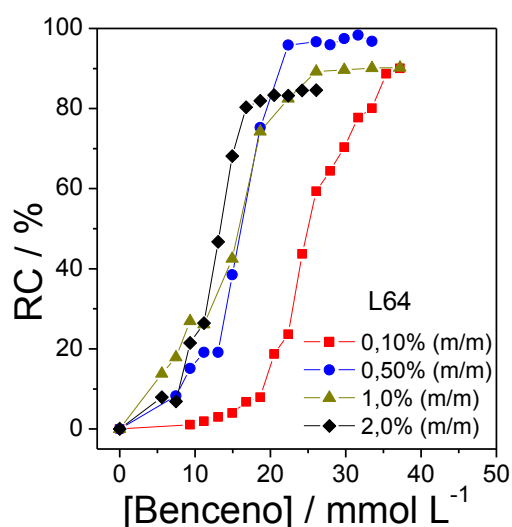


Figura 19. Respuesta Colorimétrica de nanoblendas sintetizadas en diferentes concentraciones de copolímero tribloque L64 con adición de benceno.

Para verificar la selectividad de los nanosensores formados por nanoblendas de PCDA/L64 fue investigada la RC de estas nanoestructuras en relación a otros derivados bencénicos. La figura 20 muestra el porcentaje de moléculas de PCDA que sufrieron la transición colorimétrica de azul para rojo en función de la concentración de diferentes compuestos aromáticos.

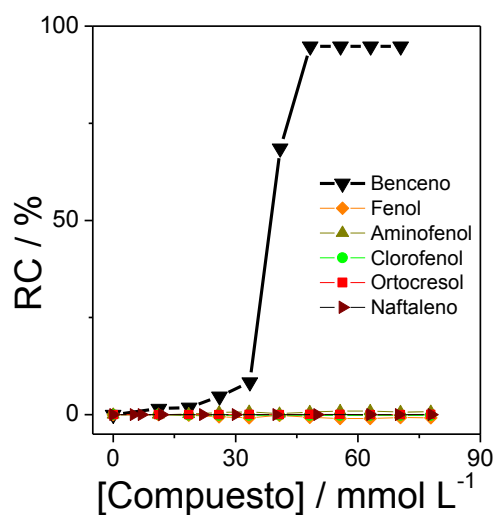


Figura 20. Respuesta Colorimétrica de vesícula de PCDA, con adición de diferentes derivados del benceno.

Queda evidente que apenas moléculas de benceno son capaces de inducir la mudanza de color azul para rojo en las nanoblendas de PCDA/L64. Moléculas de fenol, aminofenol, clorofenol, ortocresol y naftaleno no fueron capaces de inducir transición colorimétrica ni en 0,04 % (m/m). Probablemente esa falta de inducción colorimétrica es causada por la mayor solubilidad de esos compuestos en agua. La tabla 7 muestra la solubilidad del benceno y los otros compuestos.

Tabla 7. Compuestos derivados del benceno usados.

Compuesto	Solubilidad / g/L	Temperatura / °C
Benceno	1,70	20
Naftaleno	3,0	20
4- Aminofenol	16,0	20
Ortocresol	20,0	20
Clorofenol	28,5	20
Fenol	84,0	20

Actualmente existen diferentes técnicas analíticas para la cuantificación de benceno desde cromatografía gaseosa hasta espectrometría de masas. La tabla 2 muestra las diferentes técnicas con sus respectivos límites de detección [35]. Sin embargo cabe resaltar de estas técnicas son de un alto costo y además no permiten análisis in-situ.

3.3 Aplicación del nanosensor para diferentes compuestos Clorados

La figura 21 representa las respuestas colorimétricas de las nanoblendas de PCDA/L64 en función de diferentes concentraciones de diclorometano presentes en el sistema.

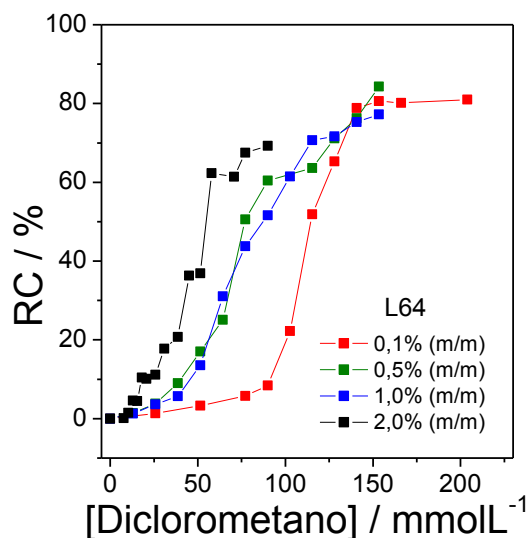


Figura 21. Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA, sintetizadas en diferentes concentraciones de copolímero tribloque L64, con adición de diclorometano.

Se observa que moléculas de diclorometano son capaces de inducir transiciones colorimétrica en concentraciones que disminuyen a medida que la concentración del copolímero tribloque aumenta. Para nanoblendas sintetizadas a concentraciones de L64 igual a 0,10 % (m/m) fue necesaria una concentración de 130 mmol L⁻¹ para inducir la transición de azul para rojo en 80% de las moléculas de PCDA. Con aumento de la concentración de L64 de 0,10 o 0,50 % (m/m) la concentración necesaria de diclorometano cayó de 130 mmol L⁻¹ para 100 mmol L⁻¹. Con la concentración igual a 1,0 a 2,0 % (m/m), 7 mmol L⁻¹ de diclorometano fueron capaces de inducir la transición colorimétrica en más del 70% de las moléculas de polidiacetileno. Este comportamiento puede ser comprendido considerando que el aumento de la concentración de L64 promueve un aumento en cantidades de los núcleos hidrofóbicos permitiendo así una mayor solubilización de las moléculas de diclorometano en el interior de las nanoblendas. Esta mayor solubilización del diclorometano disminuye la interacción PCDA –

diclorometano reduciendo así la energía necesaria la rotación de las ligaciones simples, facilitando así la transición colorimétrica de las moléculas de PCDA.

Esta capacidad de inducción de la transición colorimétrica de compuestos clorados probablemente depende de la estructura de estos compuestos, viendo que la interacción molecular es mucho más sensible a interacciones en la estructura química de las moléculas que están interaccionando, por ejemplo cuando se cambia un átomo de hidrógeno por uno de cloro pasando de diclorometano para cloroformo, esto hace que el carácter hidrofóbico de la molécula aumente permitiendo interacciones más favorables entre la molécula y las regiones hidrofóbicas del sistema. Para verificar este efecto en la estructura química en los compuestos clorados se realizó un estudio de la transición colorimétrica causada por moléculas de cloroformo. Moléculas de cloroformo son diferentes a las de diclorometano por el cambio de un átomo de hidrogeno presente en CH_2Cl_2 por una átomo de cloro generando la estructura CHCl_3 . La figura 22 muestra la RC de las nanoblendas de PCDA/L64 en diferentes concentraciones de copolímero tribloque en función de la concentración de cloroformo.

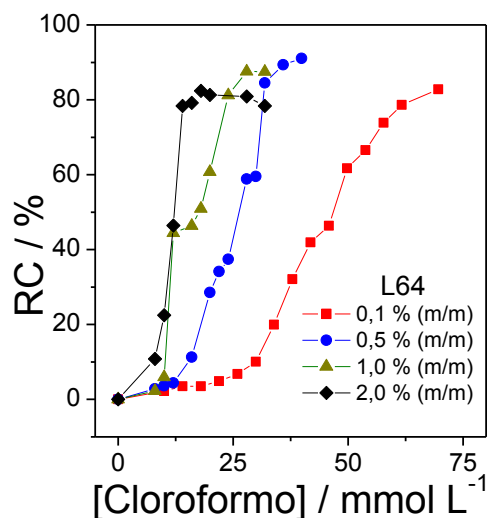


Figura 22. Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA, sintetizadas en diferentes concentraciones de copolímero tribloque L64, con adición de cloroformo.

Así como para el diclorometano el aumento en la concentración de copolímero tribloque permitió un aumento en la sensibilidad del nanosensor óptico

de PCDA/L64. Por consiguiente el límite de detección del cloroformo es bien inferior al de diclorometano. Para la máxima transición colorimétrica fueron necesarias las siguientes concentraciones de cloroformo: 75, 27, 23 y 13 milimol L⁻¹, para concentraciones de L64 iguales a 0,10; 0,50; 1,0 y 2,0 % (m/m) respectivamente. Se verifica que el cambio de un átomo de hidrogeno por uno de cloro aumento la interacción de compuesto clorado con las nanoestructuras reduciendo así la interacción PCDA – PPO permitiendo así una casi completa transición colorimétrica en baja concentración de cloroformo.

Para verificar si podríamos aumentar más la sensibilidad de los nanosensores fue testado el efecto en el cambio de una átomo más de hidrogeno por un átomo de cloro. La figura 23 muestra la RC de las nanoblendas de PCDA/L64 en diferentes concentraciones de copolímero tribloque en función de la concentración de tetracloruro de carbono.

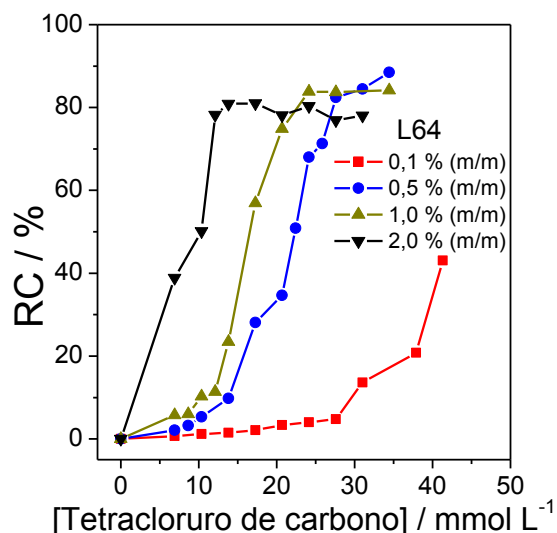


Figura 23. Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA, sintetizadas en diferentes concentraciones de copolímero tribloque L64, con adición de Tetracloruro de carbono.

Así como para los otros solventes clorados, el aumento en la concentración de copolímero tribloque hace que la máxima transición colorimétrica ocurra en concentraciones menores de tetracloruro de carbono. Por lo tanto esa disminución en la sensibilidad del nanosensor no es mayor que la observada para el cloroformo. La figura 24 muestra la RC para los tres solventes orgánicos clorados.

Queda evidente que la sensibilidad del nanosensor PCDA/L64 posee el mismo límite de detección para el cloroformo y tetracloruro de carbono, siendo este valor próximo a 10 mmol L^{-1} , por lo tanto para diclorometano es aproximadamente 15 veces mayor igual a 150 mmol L^{-1} .

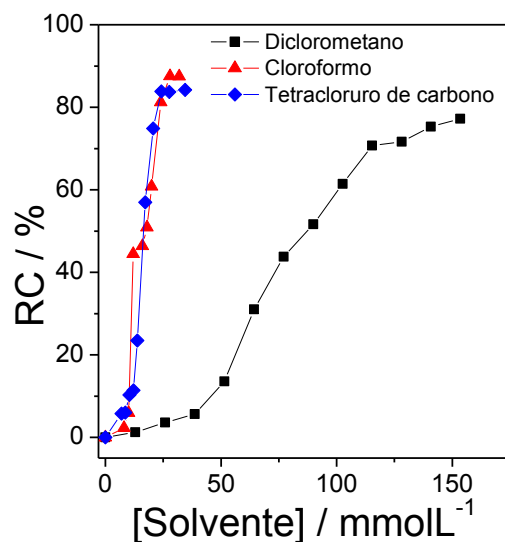


Figura 24. Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA, sintetizadas en copolímero tribloque L64 1,0 % (m/m), en función de la concentración de solventes clorados.

Se verifica así que este nanosensor no es específico para ninguno de estos compuestos clorados, no obstante es posible distinguir un intervalo de concentraciones entre diclorometano y los otros dos solventes clorados.

3.4 Aplicación del nanosensor óptico para melamina

La figura 25 muestra la RC de las nanoestructuras de vesícula clásica o de nanoblendas PCDA/L64 en la concentración de 1,0 % (m/m) de L64 en función de la concentración de melamina.

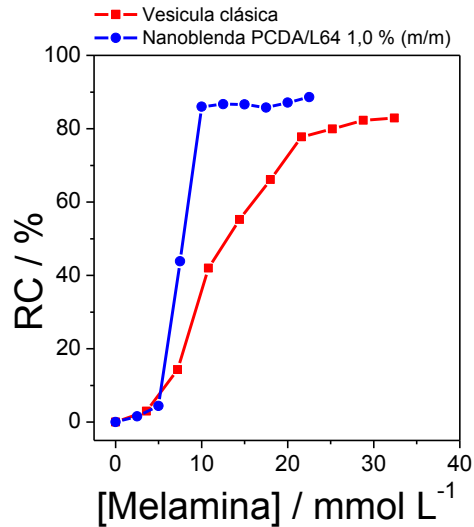


Figura 25. RC de las vesículas clásicas de PCDA y las nanoblendas de PCDA/L64 en función de la concentración de melamina.

Moléculas de PCDA presentes en las nanoestructuras de vesículas clásicas comienzan a sufrir transición colorimétrica debido a interacciones con moléculas de melamina a partir de la concentración de 5 mmol L^{-1} de este soluto. Entre 5 y 25 mmol L^{-1} ocurre una transición abrupta en la cual 80% de las moléculas de PCDA se convierten de color azul para rojo. Este comportamiento muestra que las vesículas de PCDA pueden ser usadas como sensores ópticos para presencia de melamina. Al mudar la autorganización de las moléculas de PCDA del empaquetamiento en la vesícula para la estructuración en las nanoblendas se observa una transición colorimétrica más abrupta y ocurriendo en un rango más estrecho de concentración de melamina llevando a una transición colorimétrica máxima mayor de que en las vesículas clásicas. Sin embargo las nanoblendas PCDA/L64 permiten la detección de melamina en un rango de concentración 12 veces y media menor que en la vesícula clásica. En 10 mmol L^{-1} de melamina, 90% de las moléculas de PCDA están presentes en la forma roja. Moléculas de melamina por su alto carácter hidrofóbico tienden a transferirse espontáneamente del medio acuoso para el interior hidrofóbico de las nanoblendas PCDA/L64 que son formadas por monómeros de óxido de propileno (PO) y moléculas de PCDA. Las moléculas de melamina al interactuar con segmentos de PO o segmentos PCDA alteran la interacción PCDA/PO disminuyendo así la barrera rotacional permitiendo una transición colorimétrica en

concentraciones de melamina inferiores a aquellas observadas para vesícula clásica. Aparte de esto no se puede descartar la posibilidad de la interacción entre grupos carboxílicos de PCDA con grupos aminos de la molécula de melamina a través de enlaces de hidrógeno. Con el objetivo de verificar la influencia del número de micelas formadas sobre la respuesta colorimétrica se estudió la influencia de la concentración del copolímero tribloque sobre la respuesta colorimétrica de las nanoblendas causada por la presencia de melamina. La figura 26 muestra la RC de nanoblendas sintetizadas con diferentes concentraciones de L64 (0.10, 1.0, 2.0 y 5.0 % (m/m)) en función de la concentración de melamina.

Nanoblendas sintetizadas con copolímero tribloque en concentración de L64 entre 0,10 y 1,0 % (m/m) presentaron respuestas colorimétricas inicialmente similares más las nanoblendas que contenían 0,10 % (m/m) de L64 permitieron que apenas 64 % de las moléculas PCDA fueran convertidas a color rojo, en cuanto para las nanoblendas con L64 igual a 1,0 % (m/m) aproximadamente 90 % de las moléculas de PCDA sufrieron transición colorimétrica, este comportamiento puede ser explicado considerando que en 0,10 % (m/m) de L64 las moléculas de copolímero están dispersas monomolecularmente formando regiones hidrofóbicas construidas apenas por una molécula.

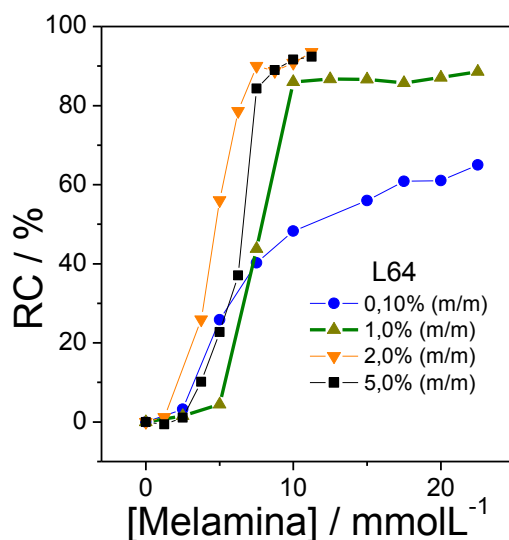


Figura 26. Respuesta Colorimétrica de nanoblendas de PCDA sintetizadas en copolímero tribloque L64 en diferentes concentraciones, con adición de melamina.

Estas regiones son pequeñas y no permiten la interacción de muchas moléculas de PCDA con los segmentos de PO. Esa pequeña región hidrofóbica no permite la solubilización de un gran número de moléculas de melamina lo que reduce la interacción melamina - PCDA o melamina - PO disminuyendo así el porcentaje de moléculas de PCDA que sufren transición colorimétrica. Con el aumento de la concentración de L64 de 1,0 % para 2,0 % (m/m) de L64 el estado de agregación de las moléculas de L64 cambian, formando más micelas generando así mayor número de núcleos hidrofóbicos capaces de solubilizar más moléculas de melamina. El aumento de la concentración de melamina en esas regiones hidrofóbicas promueve una transición colorimétrica de aproximadamente 100 % en una concentración inferior de melamina (5 mmol L^{-1}). Con aumento de la concentración de L64 de 2,0 para 5,0 % (m/m) ocurre una pequeña reducción en la sensibilidad del nanosensor probablemente causada por la formación, en esta concentración, de diferentes nanoestructuras de L64 (lamelas, micelas no esféricas, etc.).

Para verificar la contribución de la hidrofobicidad de las moléculas de melamina y también la participación de enlaces de hidrogeno se estudió el efecto del pH en la respuesta colorimétrica de las nanoblendas de PCDA/L64 con concentración de L64 de 1,0 % (m/m). Los resultados del efecto de la concentración hidrogeniónica sobre las respuestas colorimétricas son presentados en la figura 27.

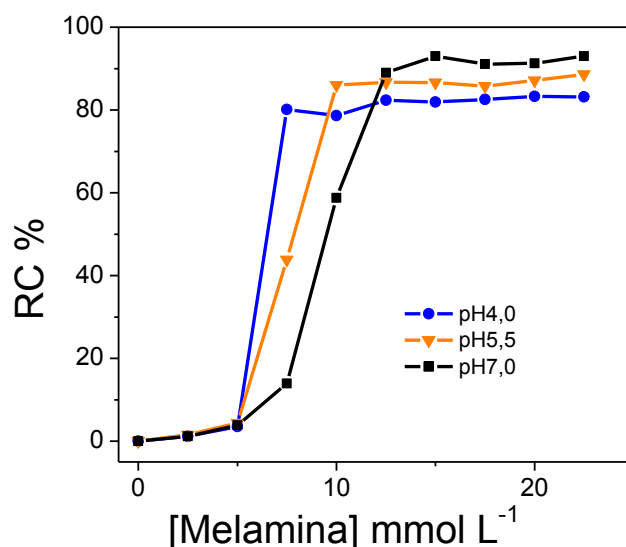


Figura 27. Estudio del pH de las nanoblendas de PCDA sintetizadas en copolímero tribloque L64 1,0 % (m/m), con adición de melamina.

Con disminución del pH ocurre la reducción de la concentración mínima de melamina necesaria para promover la máxima transición colorimétrica de las moléculas de PCDA presentes en la nanoblenda. Por lo tanto con la disminución de la concentración hidrogeniónica menor es la fracción de las moléculas de PCDA que sufren la transición colorimétrica. El pKa de la melamina es igual a 4,5 ósea que en pH encima de 4,5 las moléculas de melamina se encuentran ionizadas con carga negativa y debajo de pH 4,5 se encuentran con carga neutra. Moléculas de melamina neutras son más hidrofóbicas de que moléculas cargadas haciendo así con que en pH inferiores a 4,5 más moléculas de melamina se transfieran para el interior hidrofóbico de las nanoblendas reduciendo así la concentración mínima de melamina necesaria para promover la transición colorimétrica. Por otro lado la presencia de grupos NH_2 ionizados permite la formación de un número mayor de enlaces de hidrogeno en la interface de las nanoblendas promoviendo así la transición colorimétrica de una mayor fracción de moléculas de PCDA. Teniendo en cuenta lo anterior y sumando las dificultades de trabajar en pH ácido por posible precipitación de las nanoblendas de la misma forma que en pH básicos, entonces se determinó trabajar en pH 5,5 el cual la nanoblenda es sintetizada.

Para verificar el efecto del balance hidrofóbico e hidrofílico de las nanoblendas formadas se estudió el efecto de la estructura de los copolímeros tribloques sobre la sensibilidad de los nanosensores ópticos en respuesta a la presencia de melamina. La figura 28 muestra la RC de la interacción de diferentes nanoblendas en pH 5,5 sintetizadas en copolímeros tribloques en concentración de 1,0 % (m/m) los cuales son; L64; F68; F127 y P123.

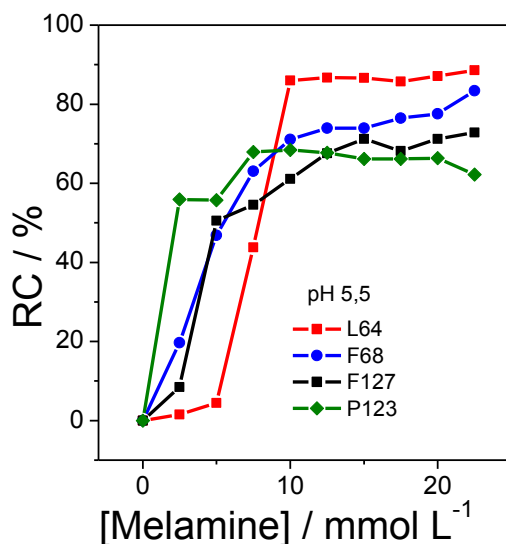


Figura 28. RC de las nanoblendas de PCDA a pH 5,5 sintetizadas en diferentes copolímeros tribloque (L64, F68, F127 y P123) todos al 1,0 % (m/m) para diferentes concentraciones de melamina.

Manteniendo el tamaño de la región hidrofóbica y aumentando la región hidrofílica, cuando comparamos nanoblendas de L64 con nanoblendas F68, se verifica que la concentración mínima de melamina necesaria para que ocurra la máxima transición colorimétrica permanece igual, por lo tanto la transición colorimétrica se inicia en concentraciones menores de melamina para nanoestructuras con regiones hidrofílicas mayores. Nanoblendas con segmentos EO en número mayor permiten la transición colorimétrica de una fracción menor de moléculas de PCDA. Posiblemente eso ocurre por qué parte de las moléculas de melamina reaccionan con estas regiones hidrofílicas. Esto demuestra que moléculas de melamina al partir para la región hidrofóbica de las nanoblendas y también reaccionando con sus regiones hidrofílicas hace que esta interacción afecte el porcentaje de moléculas de PCDA que sufren transición colorimétrica

inducida por melamina. Si el balance entre regiones hidrofóbicas e hidrofílicas del copolímero no es el adecuado, esto podría resultar en interacciones no deseadas entre la molécula a detectar y regiones del copolímero ajenas a donde se encuentran los monómeros de PDAs, observando un bajo porcentaje en la respuesta colorimétrica.

Para verificar el efecto de las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de diacetileno sobre la RC de las nanoblendas fueron sintetizadas diferentes nanoestructuras con monómeros de ácido 10, 12- tricosadiinoico (TCDA) figura 29.

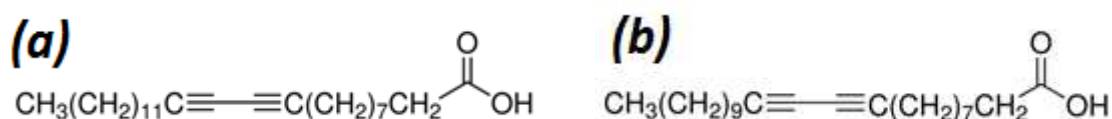


Figura 29. Estructuras de los PDAs usados (a) ácido 10, 12 Pentacosadiinoico y (b) 10, 12-Tricosadiinoico.

La diferencia en la estructura de estos dos monómeros es son dos átomos de carbono, lo que hace el PCDA que es el que tiene más átomos de carbono genere interacciones más fuertes. Así moléculas de PCDA poseen una interacción PCDA–PCDA más intensa de que TCDA–TCDA. De esta forma la perturbación que genera la molécula de melamina a interacciones débiles afecta la RC nanoblendas de TCDA, respondiendo diferente a los nanosensores de PCDA. La figura 30 muestra la RC de nanoblendas de PCDA/L64 y nanoblendas de TCDA/L64 a pH 5,5.

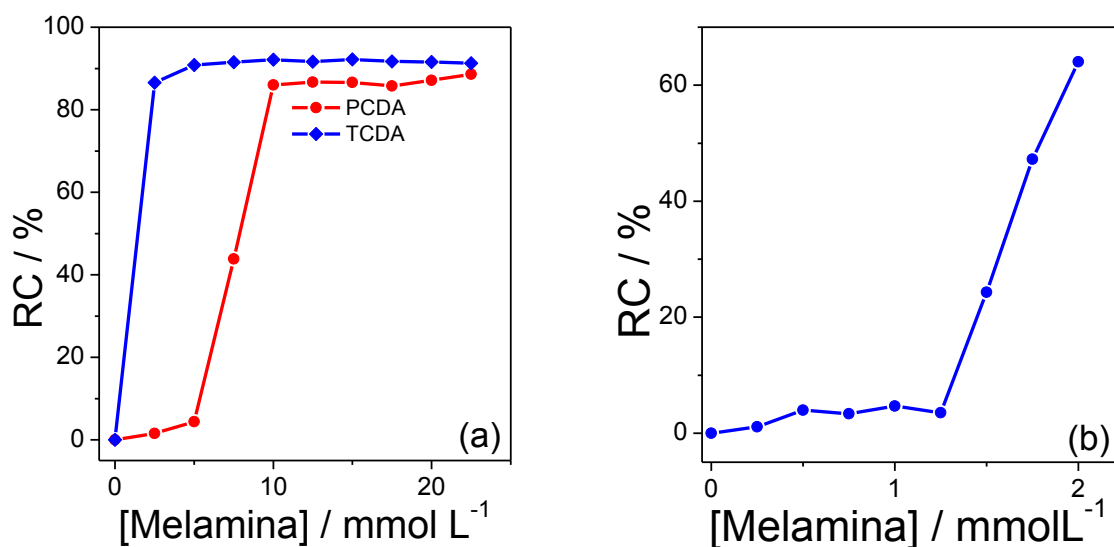


Figura 30. RCde nanoblendas de PCDA y TCDA en L64 1,0 % (m/m) en función de la concentración de melamina (a) de 0 a 25 mmol L⁻¹ y (b) en función de la concentración de melamina para nanoblendas de TCDA/L64

Nanoblendas formadas con TCDA responden a concentraciones de melamina diez (10) veces menos que nanoblendas de PCDA mostrando así que debido a la interacción TCDA – TCDA sea menor que la interacción PCDA – PCDA hace que la barrera rotacional de las nanoestructuras TCDA/L64 sea menor permitiendo así una transición colorimétrica en concentraciones menores de melamina.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

Fueron obtenidas nuevas nanoestructuras de moléculas de polidiacetileno sin ser necesario el uso de solventes orgánicos para sintetizar estos nuevos nanoagregados. Esas nanoestructuras fueron formadas por la disolución de monómeros de diacetileno en el interior de regiones hidrofóbicas formadas por bloque de polióxido de propileno perteneciente a macromoléculas de copolímeros tribloco. Estas nuevas nanoestructuras fueron aplicadas como nanosensores de los siguientes compuestos: benceno, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono y melamina. Para el benceno fue demostrado que el nanosensor es específico para este solvente sin sufrir interferencia de las siguientes moléculas: naftaleno, 4- aminofenol, ortocresol, clorofenol, fenol. Los nanosensores formados por nanoblendas fueron más sensibles que los ya conocidos nanosensores de ópticos vesiculares de PCDA. Siendo capaces de determinar concentraciones de benceno iguales o superiores a 20 mmol L^{-1} . Nanoblendas formadas con diferentes concentraciones de copolímero tribloque en el intervalo de 0,10 a 2,0 % (m/m) demostró que hay un efecto pronunciado cuando se aumenta la concentración de 0,10 para 0,50% (m/m) más este efecto se torna pequeño cuando se varia la concentración 0,50 a 2,0 % (m/m), estos resultados demuestran que la estructura de los nanoagregados formados influencia la respuesta colorimétrica de los nanosensores.

Para los compuestos clorados estudiados se verifico que las nanoblendas no eran específicas respondiendo para los compuestos de diclorometano, cloroformo y tetracloruro. Por lo tanto se observó que para las moléculas más cloradas como cloroformo y tetracloruro de carbono el nanosensor era más sensible, de esta forma se necesitó de concentraciones menores para la completa transición colorimétrica.

Este nuevo nanosensor se mostró eficiente también en la detección de melamina que es conocida como un importante adulterante de productos alimenticios. Nueva mente, los nuevos nanosensores se mostraron más sensibles que las ya

conocidas vesículas clásicas formadas ambas por moléculas de polidiacetileno. Para la detección de melamina la concentración de L64 utilizada en la síntesis de la nanoblendas tiene un pequeño efecto sobre la respuesta colorimétrica observada. El pH afecta la respuesta colorimétrica haciendo con que en pH más bajos (4,0) la respuesta de los nanosensores la respuesta sea más eficiente. Nanoblendas formadas por nanoagregados conteniendo moléculas de copolímero tribloque más hidrofóbicas tienden a presentar una mayor sensibilidad en la detección de melamina.

CAPITULO 5

BIBLIOGRAFIA

1. Carpick, R. W.; Sasaki, D. Y.; Marcus, M. S.; Eriksson, M. A.; Burns, A. R. J. *Phys.: Condens. Matter* 16, 2004, R679-R697.
2. Wegner, G. Z. *NaturforschTeil B* 24, 1969, 824-832.
3. Charych, D. H.; Nagy, J. O.; Spevak, W.; Bednarski, M. D. *Science* 261, 1993, 585-588.
4. Yarigama, O.; Jaworski, J.; Yoon, B.; Kim, J. *Chem. Commun.* 48, 2012, 2469-2485.
5. Chen, X.; Zhou, G.; Peng, X.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2012, 4610-4630.
6. Endo, O.; Ootsubo, H.; Toda, N.; Suhara, M.; Ozaki, H.; Mazki, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 2004, 9894-9895.
7. Champaiboon, T.; Tumcharern, G.; Potisatityuenyong, A.; Wacharasindhu, S.; Sukwttanasinitt, M. *Sens. Actuators B* 139, 2009, 532-537.
8. Perino, A.; Klymchenko, A.; Morere, A.; Contal, E.; Rameau, A.; Guenet, J.; Mély, Y.; Wagner, A. *Macromol. Chem. Phys.* 212, 2011, 111-117.
9. Nagy, J. O.; Zhang, Y.; Liu, E. Y. X.; Motari, E.; Song, J. C.; Lejeune, J. T.; Wang, P. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 2008, 700-703.
10. Jose, D. A.; König, B. *Org. Biomol. Chem.* 8, 2010, 655-662.
11. Chance, R. R.; Baughman, R. H.; Muller, H.; Eckhardt, C. J. *J. Chem. Phys.* 67, 1997, 3616-3618.
12. Seki, K.; Morisada, I.; Tanaka, H.; Edamatsu, K.; Yoshiki, M.; Tekata, Y.; Yokoyama, T.; Ohta, T. *Thin Solid Films.* 179, 1989, 15-20.
13. Bässler, H.; Sixl, H.; Enkelmann, V. *Advances in Polymer Science* ed H-J Cantow., 1984, Springer.
14. Sandman, D. J. *Trends Polym. Sci.* 2, 1994, 44-55.
15. Lio, A.; Reichert, A.; Ahn, D. J.; Nagy, J. O.; Salmeron, M.; Charych, D. H. *Langmuir* 13, 1997, 6524-6532.

16. Lee, D. C.; Sahoo, S. K.; Cholli, A. L.; Sandman D. J. *Macromolecules* 35, 2002, 4347-4355.
17. Tanaka, H.; Gomez, M. A.; Tonelli A. E.; Thakur, M. *Macromolecules* 22, 1989, 1208-1215.
18. Rubner, M. F.; Sandman, D. J.; Velazquez, C. *Macromolecules* 20, 1987, 1296-1300.
19. Lee, S. B.; Koepsel, R.; Stolz, D. B.; Warriner, H. E.; Russel, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 2004, 13400-13405.
20. Coe, E.; Kane, J. J.; Nguyen, T. L.; Toledo, L. M.; Winingar, E.; Fowler, F. W.; Lauher, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 1997, 86-93.
21. Kim, J. M.; Lee, J. S.; Choi, H.; Sohn, D.; Ahn, D. J. *Macromolecules*. 38, 2005, 9366-9376.
22. Biesalski, M.; Tu, R.; Tirrell, M. V. *Langmuir* 21, 2005, 5663-5666.
23. Lee, S. W.; Kang, C. D.; Yang, D. H.; Lee, J. S.; Kim, J. M.; Ahn, D. J. *Macromol. Res.* 14, 2006, 483-485.
24. Eaidkong, T.; Mungkarndee, R.; Phollookin, C.; Tumcharern, G.; Sukwattanasinitt, M.; Wacharasindhu, S. *J. Mater. Chem.* 22, 2012, 5970-5977.
25. Charoenthai, N.; Pattanatornchai, T.; Wacharasindhu, S.; Sukwattanasinitt, M.; Traiphol, R. *J. Coll. Interf. Sci.* 360, 2011, 565-573.
26. Pires, A. C. C.; Soares, N. F. F.; Silva, L. H. M.; Silva, M. C. H.; Mageste, A. B.; Soares, R. F.; Teixeira, A. V. N. C.; Andrade, N. J. *J. Phys. Chem. B* 114, 2010, 13365-13371.
27. Loh, W. *Block Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, Marcel Dekker, New York, 13, 2002, 802.
28. Lopes J. R. and Loh W, *Langmuir* 14, 1998, 750-756.
29. Pasquali R. C., Chiappetta D. A. & Bregni C., *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4), 2005, 610.
30. Alexandridis, P. & A. Hatton, *Colloid Surface* 96, 1995, 1- 46.
31. Huibers P. D. T., Lobanov V. S., Katritzky A. R., Shah D. O., Karelson M., *J. ColloidInterfSci* 187, 1997, 113-120.

32. International Agency for Research on Cancer. Some industrial chemicals and dyestuffs, Lyon, 29, 1982, 93-148.
33. Verschueren K. Handbook of environmental data on organic chemicals. New York, 1983.
34. Office of Drinking Water. Benzene. Health advisory. US Environmental Protection, Agency, 1987.
35. Khan H. A., Croatica Chemica Acta, 79 (2), 2006, 169-175.
36. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA, concepto científico presencia de melamina en preparados líquidos para lactantes, 2011.
37. Escobar A., Faure R., Sosa D., Ponce P., Vega S., Salud Animal, 32 (1) 2010, 22-31.
38. IARC. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol73/mono73-17.pdf>. Consulta Noviembre de 2012.
39. Vega S, Gutiérrez R, Díaz G, Coronado M, Salas, JH, Pérez JJ CARNILAC, 2006, 10-6.
40. Hau AK, Kwan TH, Li PK. J Am Soc. Nephrol, 20 (2), 2009, 245.
41. Baynes RE, Smith G, Mason SE, Barrett E, Barlow BM, Riviere JE. FoodChemToxicol, 46, 2008, 196-200.
42. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) and EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). EFSA Journal 8 (4), 2010, 1573.
43. FDA. Melamine Contamination In China. Disponible en: <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm179005.htm>. Consulta Noviembre de 2012.
44. FAO/WHO. Revisión de la toxicología de la melamina y el ácido cianúrico. Respaldo por HealthCanada. Ottawa (Canadá). 2008.
45. Lund KH, Petersen JH., Food additives and contaminants, 23 (9), 2006, 48-55.
46. Ehling S, Tefera S, Ho IP. FoodAdditContam, 24 (12), 2007, 19-25.
47. Ehling S, Tefera S, Ho IP, FoodAdditContam. 42 (2), 2009, 29-38.

48. Baynes RE, Smith G, Mason SE, Barrett E, Barlow BM, Riviere JE, FoodChemToxicol, 46 (1), 2008, 196-200.
49. WHO/HSE-FOS. Analytical Methods Available for Detecting and Quantifying Melamine and Cyanuric Acid in Food (and Feed). 2008.
50. Wang L, Xiaodong L, Tracy M, Schnute B, Birznieks I, Pohl C, LC-GC North America, 25, 2007, 40.
51. Litzau JJ, Mercer GE, Mulligan KJ. GC-MS Screen for the Presence of Melamine, and Cyanuric Acid. <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4423.html>. 2008, 24.
52. Cai M, Yu C, Zou Y, Luan W, Agilent Technologies www.agilent.com/chem. 2008.
53. Filigenzi MS, Tor ER, Poppenga RH, Aston LA, Puschner B., Rapid Communications In Mass Spectrometry: RCM. 21 (24), 2007, 27-32.
54. Filigenzi MS, Puschner B, Aston LS, Poppenga RH. J Agr Food Chem, 56 (17), 2008, 7593.
55. Varelis P, Jeskelis R., FoodAdditContam. 25 (10), 2008, 1210.
56. Luan W, Fang Y, Zweigenbaun J. from www.agilent.com/chem. 2007.
57. Turnipseed S, Casey C, Nochetto C, Heller DN. Laboratory Information Bulletin No 4421. from: <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4421.html>. 24, 2008.
58. Smoker M, Krynitsky AJ. Laboratory Information Bulletin No 4422 from: <http://www.cfsan.fda.gov/frf/lib4422.html>. 2008.
59. Garber EAE. J. Food Protect. 71 (3), 2008, 590.
60. Seminar Publication. Risk Assessment, Management and Communication of Drinking Water Contamination. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Office of Research and Development Washington DC 20460, 1990, 3 – 4.
61. Tobiszewski M, Namieśnik J, Anal Bioanal Chem, 2011, 399, 3565–3572.