

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 260**

51 Int. Cl.:  
**C07B 63/00** (2006.01)  
**C07C 243/06** (2006.01)  
**C07D 213/42** (2006.01)  
**C08F 236/02** (2006.01)  
**A24B 15/18** (2006.01)  
**A24D 3/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05744145 .3**  
96 Fecha de presentación: **24.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1756023**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Polímeros impresos molecularmente selectivos para nitrosaminas y procedimientos para usarlos**

30 Prioridad:  
**24.05.2004 US 573337 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.07.2012**

73 Titular/es:  
**BRITISH AMERICAN TOBACCO (INVESTMENTS)  
LIMITED  
GLOBE HOUSE 1 WATER STREET  
LONDON WC2R 3LA, GB**

72 Inventor/es:  
**BHATTACHARYYA, Sumita;  
MCADAM, K.;  
REES, Anthony;  
SELLERGREN, Börje y  
WIDSTRAND, Christine**

74 Agente/Representante:  
**de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 384 260 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Polímeros impresos molecularmente selectivos para nitrosaminas y procedimientos para usarlos.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una clase de polímeros impresos molecularmente y al uso de polímeros impresos molecularmente en bioanálisis y separación de metabolitos de nicotina. La invención se refiere además a procedimientos para usar los polímeros impresos molecularmente para tratar tabaco, sustitutos de tabaco, y sus derivados para reducir en los mismos el nivel de compuestos que se consideran dianas.

**Antecedentes de la invención**

10 En los campos de las ciencias médicas, nutricionales, medioambientales y químicas hay necesidad creciente de realizar alguna separación selectiva de sustancias específicas en mezclas complejas de sustancias emparentadas. El objetivo puede ser la extracción cuantitativa de cierto compuesto o compuestos, la medición de su concentración, o la retirada selectiva de un compuesto diana de una mezcla multicomponente.

15 Unos controles sanitarios más estrictos han hecho subir la demanda de procedimientos que permitan la cuantificación sensible y selectiva de productos peligrosos y metabolitos de ciertas sustancias cotidianas de uso ampliamente extendido. De particular interés son los compuestos químicos emparentados con el uso de productos a base de tabaco, compuestos que están presentes originalmente en la propia hoja de tabaco de partida o que se generan durante el acto de fumar. Se considera que los compuestos que contienen algún grupo nitroso, tales como las nitrosaminas, son de especial significación a este respecto.

20 Con el objetivo de reducir la incidencia de los peligros de fumar, se han elaborado ciertos productos farmacéuticos que contienen solo la sustancia neuroactiva, nicotina, la sustancia química que se reivindica que es responsable de los aspectos de dependencia del material fumable.

25 Entre las formulaciones de nicotina en terapias para dejar de fumar, el chicle de nicotina ha encontrado el uso más ampliamente extendido. El control de calidad que se requiere durante su producción incluye vigilar el nivel de nicotina (2 a 4 mg por pieza de chicle) así como vigilar los productos primarios de oxidación de nicotina, cotinina, miosmina, cis-N-óxido de nicotina, trans-N-óxido de nicotina y beta-nicotirina. También es deseable, cuando no exigida, la cuantificación de normicotina, anatabina y anabasina. Según la Farmacopea de EE.UU. (U.S.P.) la formulación del chicle debería contener entre 95% y 110% de la cantidad de nicotina declarada en la etiqueta y la cantidad de cada producto de oxidación no debería exceder de 0,1% de la cantidad de nicotina.

30 A pesar del uso de sustitutos de cigarrillos de este tipo, se pueden producir in vivo metabolitos de nicotina como nitrosamina por procesos metabólicos naturales durante la residencia de la nicotina dentro de los tejidos corporales. Los niveles de estos metabolitos se mantienen por debajo de las concentraciones a las que la mayoría de los procedimientos analíticos se pueden llevar a cabo cuantitativamente. Por lo tanto la necesidad de procesos que sean capaces de vigilar estos niveles, así como los niveles de otros metabolitos de nicotina, es de importancia. Típicamente, dicha vigilancia se lleva a cabo sobre muestras de orina humana en las que los niveles de tales sustancias carcinógenas sospechosas son extremadamente bajos.

35 Los compuestos que se consideran diana para cuantificación, reducción o retirada de tabaco o humo son conocidos e incluyen los componentes principales de nitrosaminas específicas del tabaco (TSNAs) y sus precursores alcaloides: NNK, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona; NNA, 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)butanal; NNN, N-nitrosanormicotina; NAB, N-nitrosoanabasina; NAT, N-nitrosoanatabina; NNAL, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol; iso-NNAL, 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)-1-butanol; iso-NNAC, ácido 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)butanoico.

40 Para cuantificar apropiadamente cuánto de cada compuesto que se considera diana está presente en los fluidos biológicos humanos, se están desarrollando procedimientos para analizar en el tabaco los alcaloides, especialmente los productos y metabolitos de descomposición nitrosilados. Los procedimientos existentes de separación cromatográfica o extracción usados para este análisis carecen de la robustez, sensibilidad y velocidad requeridas para manejar el gran número de muestras que se genera cuando se estudia una población general. Con los procedimientos existentes, la baja concentración de nitrosaminas, que están típicamente presentes en picogramos por mililitro, demanda una considerable preparación de la muestra con extracciones multietapa y a menudo derivatización química (por ejemplo deuterización previa a espectrometría de masas) del analito previa al análisis.

45 Una razón de esta complejidad es que los materiales de separación existentes no son selectivos como, por ejemplo, un anticuerpo o receptor biológico puede ser para los metabolitos en cuestión sino que se basan más bien en propiedades fisicoquímicas como la carga o la hidrofobia de los metabolitos para el comportamiento de separación. Estas propiedades químicas se pueden compartir con otras muchas moléculas irrelevantes en la muestra.

50 Un procedimiento típico podría implicar hasta siete etapas de trabajo que incluyen centrifugaciones, ajustes de pH, tratamientos enzimáticos, etc., que pueden sumar hasta un tiempo de preparación de muchas horas o incluso días

por muestra. Con procedimientos tan engorrosos, la pérdida de material durante el proceso puede conducir a errores en la estimación de las concentraciones de la muestra original, que requieren extrapolación por retroceso de la medida final, en lugar de depender de una medición directa, para obtener la concentración en la muestra original. Por lo tanto, un procedimiento rápido y sencillo para el análisis de nitrosaminas específicas de tabaco es una significativa necesidad analítica médica sin satisfacer. (Véanse, por ejemplo Byrd & Ogden, *Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 38, 98-107 y Wu y col., *Anal. Chem.* 2003,75, 4827-4832).

En los últimos años, han aparecido numerosos informes sobre reconocimiento selectivo de moléculas pequeñas con materiales preparados por impresión molecular (polímeros impresos molecularmente o MIP). Véase, por ejemplo, Wulff, G. *Angew. Chemie. Int. Ed. Engl.* 1995 (34) 1812. Los MIP son polímeros que tienen sitios reactivos adaptados para unirse selectivamente con compuestos que se consideran dianas. Se han usado materiales impresos molecularmente preparados de modo covalente, para reconocimiento de quiral de diversas moléculas pequeñas que incluyen fármacos terapéuticos, azúcares, bases de nucleótidos, y plaguicidas, así como hormonas esteroideas y peptídicas. Ejemplos de los mismos se describen, por ejemplo, en Sellergren, B. *Trends Anal. Chem.* 1997 (16) 310. La afinidad y la selectividad altas para el analito diana que exhiben algunos de los materiales impresos han justificado la comparación con las correspondientes fases de la inmuno-afinidad (IA). Sin embargo, en contraste con estas últimas fases, los materiales MIP son directos de preparar, estables en la mayoría de los medios y reutilizables a lo largo de prolongados períodos de tiempo.

Por lo tanto, están bajo investigación aplicaciones de los materiales de MIP en cromatografía, separación (continua o por lotes), detección química o en análisis específicos.

Otra aplicación es la extracción en fase sólida (SPE, véase Mayes, A. G.; Mosbach, K. *Trends Anal. Chem.* 1997, 16, 321) de analitos presentes en concentraciones bajas en muestras biológicas, o en matrices complejas. La SPE puede conducir a enriquecimiento selectivo y limpieza de analito hasta niveles no alcanzables con los procedimientos existentes. Las extracciones en fase sólida impresa molecularmente (MISPE) se han usado en bioanálisis, análisis de alimentos y análisis medioambiental. En estos ejemplos se obtiene enriquecimiento selectivo y limpieza del analito lo que da como resultado una precisión más alta y un descenso del límite de detección (LOD) en la posterior cuantificación cromatográfica (por ejemplo HPLC) o por espectrometría de masas.

En vista de su alta selectividad combinada con buena afinidad para la molécula diana o el grupo de moléculas diana, los MIP han despertado un considerable interés por parte de la industria alimentaria como herramienta para mejorar la calidad de los alimentos. Esto requiere el uso de MIP para la retirada selectiva de componentes indeseables de la matriz del alimento. Como estos componentes están presentes a menudo en concentraciones bajas, la capacidad de saturación del MIP no es típicamente un factor limitante.

El material preferido de MIP de la invención diseñado específicamente es capaz de absorber selectivamente los derivados nitrosilados de nicotina más comunes de matrices complejas, tales como orina, dando recuperación cuantitativa y conduciendo por lo tanto a errores pequeños en la estimación de las concentraciones de dichas sustancias químicas peligrosas.

Además de la cuantificación, es también muy conocido el intento de reducir los efectos nocivos de consumir material que contiene tabaco, sustitutos de tabaco o mezclas de los mismos reduciendo los niveles de los compuestos que se consideran diana. Dichas reducciones se pueden hacer en el propio material o en un derivado del mismo tal como un extracto del material. La reducción también se puede efectuar en los productos de descomposición térmica del material, esto es en el humo de la corriente principal o de la corriente lateral que se obtiene por combustión, o los aerosoles que se producen calentando el material a una temperatura por debajo de su temperatura de combustión.

Un procedimiento muy bien conocido para esta clase de reducción es el de poner en contacto los productos de descomposición térmica del material con un filtro que adsorbe los componentes indeseados de los mismos. Un procedimiento alternativo implica extracción con disolventes del material, por ejemplo, según se describe en la patente de EE.UU. US-5601097. Según la memoria de dicha patente, el contenido en proteínas del material de tabaco se reduce tratando el tabaco con una disolución que contiene un tensioactivo para extraer polipéptidos, separando la disolución, retirando el tensioactivo y los polipéptidos de la disolución, y recombinado la disolución con el material de tabaco. La patente internacional WO 01/65954 describe un procedimiento en el que se pone en contacto tabaco con un fluido de extracción supercrítico tal como dióxido de carbono supercrítico para reducir selectivamente o eliminar nitrosaminas.

Estos procedimientos son igualmente aplicables tanto al propio tabaco como a los sustitutos de tabaco esto es, materiales naturales o sintéticos que tienen características similares a las del tabaco natural que permiten consumirlos de manera similar al tabaco, ya sea fumando, masticando, mediante inhalación, o de otra forma.

Ha habido un intento de retirar nicotina del humo de tabaco usando MIP, como han informado Liu, Y., y col., *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Sorbent for Removal of Nicotine from Tobacco Smoke*, *Analytical Letters*, Vol. 36, N° 8, págs. 1631-1645 (2003). El MIP que se describe en el artículo se había diseñado para unirse a nicotina y no a los metabolitos de nicotina más tóxicos tales como las nitrosaminas. No está claro si el MIP era realmente selectivo para nicotina puesto que el método científico que producía los datos carecía de los elementos

clave de las comprobaciones de control.

Por lo tanto, sigue existiendo necesidad en la técnica de nuevos MIP y procedimientos de empleo de los mismos, particularmente en el campo de la nicotina y los metabolitos de nicotina.

**Resumen de la invención**

5 La presente invención proporciona un polímero impreso molecularmente (MIP) selectivo al menos para una nitrosamina específica de tabaco, en el que dicho polímero impreso molecularmente se obtiene usando como plantilla un análogo funcional o estructural de una nitrosamina específica de tabaco.

10 En una realización de la invención se proporciona el polímero impreso molecularmente, en el que dicha al menos una nitrosamina se deriva de nicotina, normicotina, anabasina o anatabina. Los MIP de la invención se pueden obtener, por ejemplo, copolimerizando un monómero o monómeros funcionales y un reticulador en presencia de un análogo estructural de una nitrosamina específica de tabaco, en un medio de polimerización que contiene un iniciador de radicales libres, tras de lo cual se retira la plantilla del MIP.

15 La invención incluye el uso de los polímeros impresos molecularmente de la invención para extracciones analíticas y preparativas, en cromatografía, para pretratamiento de muestras analíticas, en sensores químicos o como filtro en fase sólida para extracción de nitrosaminas de nicotina en sustancias o dispositivos que contienen nicotina.

20 Adicionalmente, la invención incluye un procedimiento para reducir el nivel de un componente que se considera diana en un producto de tabaco, en el que el producto de tabaco se trata con un MIP que es selectivo al menos para un compuesto de contiene algún grupo nitroso. Además, la invención proporciona procedimientos para fabricar un material para fumar que incorpora el uso de MIP para retirar selectivamente compuestos que contienen algún grupo nitroso.

La presente invención incluye el tratamiento de productos de tabaco con MIP para reducir en los mismos el nivel de compuestos que contienen algún grupo nitroso.

25 En esta memoria de patente, "producto de tabaco" quiere dar a entender un material que contiene tabaco (incluyendo hoja de tabaco o tallo de tabaco), o un sustituto de tabaco, o una mezcla de tabaco y sustitutos de tabaco, y derivados de dicho material, incluyendo extractos del material, humo producido por la descomposición térmica del material y aerosoles producidos calentando el material por debajo de su temperatura de combustión.

30 Cuando el producto de tabaco es un derivado producido por la descomposición térmica del material que contiene tabaco o un sustituto de tabaco, la descomposición se puede efectuar por combustión del material, como en un cigarrillo convencional, o calentando el material a una temperatura por debajo de su temperatura de combustión, conforme a un procedimiento que se usa en algunos productos alternativos de tabaco conocidos para producir un aerosol que es inhalado por el consumidor.

35 Como alternativa, el producto de tabaco puede ser un derivado que se produce poniendo en contacto material que contiene tabaco o un sustituto de tabaco con un disolvente. En particular, la invención proporciona un procedimiento para fabricar un material para fumar que comprende las etapas de extraer material fumable con un disolvente, tratar el extracto con un polímero impreso molecularmente que es selectivo al menos para un compuesto con algún grupo nitroso para reducir el nivel del mismo en el extracto y combinar el extracto tratado con el material fumable.

40 En este procedimiento, el material fumable puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo polvo, tallos, recortes, lámina cortada, picadura de tallos o cualquier combinación de las mismas. El disolvente puede ser acuoso o no acuoso, tal como metanol, etanol o un medio de extracción de fluido supercrítico, tal como dióxido de carbono líquido supercrítico. La extracción se puede llevar a cabo en condiciones cualesquiera que favorezcan la extracción de los compuestos que contienen nitrógeno del tabaco.

La invención también incluye un artículo para fumar que comprende tabaco o sustituto de tabaco y un polímero impreso molecularmente selectivo para la retirada de al menos un compuesto que contiene algún grupo nitroso del producto de la descomposición térmica del mismo.

45 El artículo para fumar de la invención puede tomar cualquier forma convencional, por ejemplo, un cigarrillo, cigarro puro, o purito. En particular el artículo para fumar puede comprender un cilindro de material para fumar opcionalmente en una envoltura, con o sin filtro. La envoltura puede ser de papel, hoja de tabaco, tabaco reconstituido o de un sustituto de tabaco. Como alternativa, por ejemplo, cuando el artículo para fumar está diseñado para producir bajas emisiones de humo de corriente lateral o bajos niveles de productos de pirólisis en el humo de la corriente principal, la envoltura puede estar compuesta de material inorgánico no combustible tal como un material  
50 El filtro puede ser de cualquier material adecuado, por ejemplo acetato de celulosa fibroso, polipropileno o polietileno, o papel.

El material para fumar es preferiblemente tabaco pero puede ser un sustituto de tabaco tal como un material para fumar que no es tabaco. Ejemplos de materiales para fumar que no son tabaco son materiales vegetales secos y

- curados, incluyendo materiales de frutas y un material para fumar sintético tal como el que se puede producir a partir de alginatos y una sustancia que genera aerosoles tal como glicerol. El material para fumar también puede comprender una mezcla de tabaco y materiales para fumar que no son tabaco. Cuando el material para fumar comprende tabaco, el tabaco puede ser de cualquier tipo adecuado, o una mezcla de los mismos, que incluye lámina o tallo curado al aire, curado al fuego, curado en atmósfera artificial, curado al sol, y puede haberse procesado usando cualquier proceso apropiado. Por ejemplo, el tabaco se puede cortar, picar, expandir o reconstituir. El material para fumar también puede incluir aditivos convencionales, tales como mejoradores, colorantes, humectantes (tales como glicerol y propilenglicol), cargas inertes (tales como creta), y saborizantes (tales como azúcar, regaliz o cacao).
- 10 La invención también se puede aplicar a tabaco que se ha diseñado para consumo oral o nasal, chupando, mascando, o con ingestión nasal, en lugar de fumarlo. Productos de este tipo incluyen rapé, snus y tabaco "duro" o de mascar.
- El material impreso molecularmente se puede incorporar en el material fumable. Por consiguiente, la invención incluye material para fumar que contiene un polímero impreso molecularmente selectivo para la retirada al menos de un compuesto que contiene algún grupo nitroso de los productos de descomposición térmica del material fumable.
- 15 Como alternativa, cuando el artículo para fumar comprende un cilindro de material fumable dentro de una envoltura, el material impreso molecularmente se puede incorporar en la envoltura. Por lo tanto, la invención incluye material de envoltura para artículos para fumar que comprende un polímero impreso molecularmente selectivo para la retirada de un componente que se considera diana de los productos de descomposición térmica de un material para fumar. La envoltura puede ser un material a base de celulosa tal como un papel o un material a base de tabaco tal como tabaco reconstituido.
- Los artículos para fumar preferidos de la invención son cigarrillos, que comprenden un cilindro de tabaco, envoltura, y un filtro que incluye un polímero impreso molecularmente selectivo para la retirada al menos de un compuesto que contiene algún grupo nitroso de los productos de descomposición térmica de un material fumable.
- 20 La invención también incluye un filtro para el humo que comprende un polímero impreso molecularmente selectivo para la retirada al menos de un compuesto que contiene algún grupo nitroso de los productos de descomposición térmica de un material para fumar. El filtro para el humo se puede producir por separado del artículo para fumar, por ejemplo en forma de una boquilla de cigarrillo o cigarro, o se puede integrar en el artículo para fumar, por ejemplo en forma de un cigarrillo con una punta de filtro.
- Los filtros para el humo en forma de puntas de filtro pueden ser de cualquier construcción convencional. Por ejemplo, puede estar en forma de un filtro de tipo "dálmeta" que comprende una sección de material fibroso de filtro, tal como acetato de celulosa, estando el polímero impreso molecularmente en forma de partículas y distribuido en toda la extensión de la sección. Como alternativa, el filtro puede estar en forma de un filtro de tipo "cavidad", que comprende múltiples secciones en las que el polímero impreso molecularmente se puede situar entre dos secciones adyacentes del material fibroso de filtro. El filtro para el humo también puede comprender otros materiales absorbentes tales como una resina de intercambio iónico, una zeolita, sílice, alúmina o amberlita.
- 25 Durante el uso, el humo pasa a través del filtro, el polímero impreso molecularmente absorbe selectivamente y retiene los compuestos que se consideran diana del humo y el humo filtrado pasa al fumador.
- Los filtros para el humo y los artículos para fumar según la invención pueden incluir medios para proteger el polímero impreso molecularmente del humo, o reducir su exposición, cuando está en uso. Esto se puede conseguir de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, el filtro para el humo puede comprender un elemento de filtro para adsorber materiales del vapor o fase en partículas del humo. Los elementos del filtro de este tipo pueden comprender un adsorbente general tal como carbón activado, que puede estar en cualquier forma conveniente, tal como hebras, partículas, gránulos, tela o papel. El elemento del filtro también puede ser un adsorbente selectivo tal como una resina de intercambio iónico, una zeolita, sílice, alúmina o amberlita. Los medios para proteger al catalizador pueden incluir dos o más elementos de filtro de este tipo de diferentes composiciones, por ejemplo, un primer elemento de filtro de acetato de celulosa, y un segundo elemento de filtro de carbón activado. La provisión de múltiples elementos de filtro en filtros para el humo y artículos para fumar es bien conocida, y se pueden usar cualquier configuración convencional de filtro, y procedimientos de construcción adecuados.
- 30 **Breve descripción de los dibujos**
- La Figura 1 muestra un esquema del procedimiento para la síntesis de un polímero impreso;
- La Figura 2 muestra el grupo funcional nitrosamina y ejemplos de dianas de nitrosamina emparentadas con nicotina;
- La Figura 3 muestra análogos isoestéricos de nitrosaminas;
- La Figura 4A muestra ejemplos de análogos de dianas a base de amida y sulfonamida;

La Figura 4B muestra un análogo de diana de enamina (MPAPB) que se usa como plantilla para preparar un MIP para extracción de NNAL;

La Figura 4C muestra piridincarbinol usado como plantilla para preparar un MIP para extracción de NNAL;

La Figura 5 muestra las tasas de recuperación de NNAL usando un MIP selectivo para NNAL;

5 La Figura 6 muestra los cromatogramas obtenidos tras análisis de 1 ml de orina humana al que se ha añadido 0,25 µg de NNAL (representado por la línea delgada) y 1 ml de orina humana de ensayo en blanco (representado por la línea gruesa);

10 La Figura 7 muestra una superposición de cromatogramas obtenidos tras análisis de muestras en presencia de nicotina donde la línea continua representa muestra a la que se ha añadido NNAL y nicotina, la línea discontinua representa eluyente recogido tras cargar 1ml de la muestra a la que se ha añadido NNAL y nicotina, y la línea larga discontinua representa un lavado de  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH 4,5;

La Figura 8 es una vista de perfil, en sección parcialmente longitudinal y parcialmente fracturada de un artículo para fumar con un filtro para el humo según la invención;

15 La Figura 9 es una vista similar a la de la Figura 8 de un artículo para fumar con un filtro para el humo alternativo según la invención;

La Figura 10 muestra la estructura química y el punto de ebullición para tres productos que se describen en el Ejemplo 6; y

La Figura 11 muestra la estructura química y el punto de ebullición para nitrosaminas volátiles seleccionadas.

En los dibujos, se dan rasgos similares como números de referencia.

## 20 Descripción detallada

Típicamente, la impresión molecular consiste en las siguientes etapas: (1) se deja que interaccione un compuesto de plantilla, que puede ser la molécula que se considera diana o un análogo estructural de la misma, con un monómero, o varios monómeros funcionales seleccionados, en disolución para formar un complejo plantilla-monómero; (2) el complejo plantilla-monómero se copolimeriza con un monómero reticulador dando como resultado una matriz polimérica que incorpora el compuesto de plantilla; (3) el compuesto de plantilla se extrae de la matriz de polímero para formar un MIP que se puede usar para unión selectiva a la molécula que se considera diana. Antes de la etapa (3), en la que el MIP se prepara como un polímero sólido (o monolito) típicamente se tritura y se tamiza para obtener una fracción del tamaño deseado del material en partículas. Cuando se prepara mediante procedimientos de polimerización en suspensión o en emulsión, dichas trituración y tamizado son innecesarias puesto que el tamaño de partícula se puede controlar dentro de los límites deseados durante el proceso de polimerización. El material en partículas preparado por cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados se puede empaquetar en una columna cromatográfica o de extracción en fase sólida y se puede usar para separación cromatográfica de la plantilla de los otros componentes de la mezcla, que incluyen moléculas con estructuras o funcionalidades similares.

35 Los sitios reactivos sobre el polímero impreso molecularmente que quedan expuestos por la retirada del compuesto de plantilla estarán en una configuración estereoquímica apropiada para reacción con moléculas nuevas de la molécula que se considera diana. Como resultado, el polímero se puede usar para unión selectiva a la molécula que se considera diana.

40 Actualmente, la técnica que se aplica más ampliamente para generar sitios de unión impresos molecularmente es la vía de la ruta "no-covalente". Esta hace uso del auto-ensamblaje no covalente del compuesto de plantilla y los monómeros funcionales para formar el complejo plantilla-monómero, a lo que sigue polimerización por radicales libres en presencia de un monómero reticulador y finalmente extracción del compuesto de plantilla. La impresión covalente, en la que la molécula de plantilla y un monómero o monómeros adecuados se unen entre ellos de manera covalente antes de la polimerización, también se puede llevar a cabo según procedimientos conocidos. Las propiedades de unión de los MIP formados por unos u otros de los procedimientos anteriores se pueden examinar volviendo a unirlos a la molécula de plantilla.

45 La polimerización se realiza en presencia de un disolvente que forma poros que se denomina porógeno. Para estabilizar las interacciones electrostáticas entre los monómeros funcionales y el compuesto de plantilla a menudo se elige el porógeno entre disolventes apróticos de polaridad baja a moderada. Idealmente, los compuestos de plantilla exhiben solubilidad moderada a alta en los medios de polarización, y aquellos, o sus análogos estructurales, se pueden usar por tanto directamente usando este procedimiento estándar.

50 Aun cuando es posible usar la propia molécula que se considera diana como plantilla, comúnmente se prefiere un análogo estructural de la molécula diana porque: (a) la molécula que se considera diana puede que sea inestable en las condiciones de polimerización o puede que inhiba la polimerización; (b) la molécula que se considera diana

5 puede que no esté disponible en cantidades suficientes debido a la complejidad de su síntesis o coste, o de ambos; (c) la plantilla puede que sea insoluble o escasamente soluble en la mezcla de polimerización; (d) el MIP puede quedar contaminado por niveles bajos de de la molécula que se considera diana retenidos en regiones difícilmente accesibles de la matriz de polímero, que pueden exudar del MIP durante el uso; y/o (e) el(los) analito(s) diana puede que presente(n) riesgo significativo para la salud y no se debe(n) usar como plantilla(s).

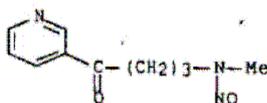
En el caso de compuestos con grupo nitroso, particularmente los compuestos conocidos como TSNA que se describen a continuación, a menudo es más conveniente usar análogos funcionales de los mismos como compuestos de plantilla. Por ejemplo, derivados de glucosa de TSNA pueden ser particularmente útiles como compuestos de plantilla, véase Figura 2.

10 Cuando se deriva el MIP usando un análogo funcional del compuesto que se considera diana, el análogo funcional debería ser isoestérico y preferiblemente también isoelectrónico con el compuesto que se considera diana, o puede contener una subestructura del compuesto que se considera diana en la que es probable que haya interacciones fuertes.

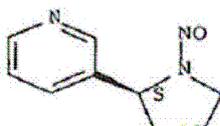
15 Los compuestos que contienen algún grupo nitroso, particularmente las nitrosaminas, que tienen la fórmula general  $O=N-N(R_1)(R_2)$  están entre los numerosos ingredientes del tabaco y del humo del tabaco que se ha sugerido que tienen efecto nocivo sobre los consumidores.

20 Una clase particular de compuestos con grupo nitroso a los que es aplicable la presente invención es el grupo de nitrosaminas que se dan naturalmente en el tabaco, conocidas como nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA), que se derivan de los alcaloides que se dan naturalmente en el tabaco, concretamente nicotina, nor nicotina, anabasina y anatabina. Las TSNA incluyen:

4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona ("NNK"):

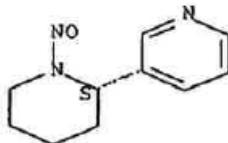


N'-nitrosornicotina ("NNN"):

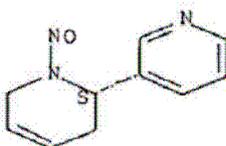


25

N'-nitrosoanabasina ("NAB"):

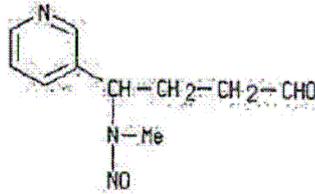


N'-nitrosoanatabina ("NAT"):



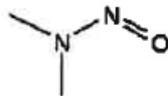
30

4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)-1-butanol ("NNA"):

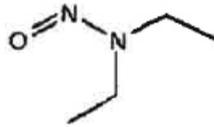


5 Además, un grupo de compuestos conocidos como nitrosoaminas volátiles se encuentra en la fase vapor del humo del tabaco. Este grupo incluye los siguientes compuestos:

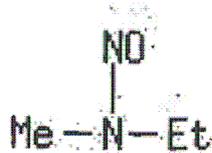
N'-nitrosodimetilamina ("NDMA"):



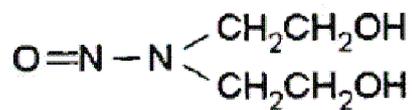
10 N'-nitrosodietilamina ("NDEA"):



N'-nitrosoetilmetilamina ("NP"):

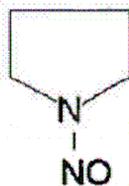


N-nitrosodietanolamina:



15 Otros compuestos que contienen algún grupo nitroso también se han identificado en estudios químicos del tabaco o del humo del tabaco, por ejemplo:

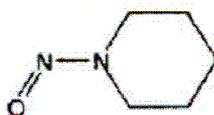
N-nitrosopirrolidina ("NYPR"):



N'-nitrosometilbutilnitrosamina ("BMNA"),

N'-nitroso-n-butilamina ("NBA")

5 y N'-nitrosopiperidina ("NIP"):



10 En la Figura 3 se observan posibles análogos isoestéricos que se pueden considerar dianas de nitrosaminas. Las moléculas que se muestran son todas derivadas de la amina progenitora y se pueden sintetizar en una sola etapa desde la amina secundaria y el correspondiente aldehído o cloruro de ácido. Los modelos moleculares de la enamina (Figura 4A) han mostrado buena complementariedad estérica con una de las nitrosaminas de interés, NNAL.

15 Durante el diseño de un compuesto de plantilla adecuado para el analito diana NNAL, se identificó una plantilla particularmente interesante, correspondiente a la subestructura de piridincarbinol pero que carecía sorprendentemente del resto nitrosamina (Figura 4B). Si se puede obtener suficiente afinidad y selectividad de unión para dichas plantillas subestructurales, esta es la aproximación preferida. Realmente, la afinidad de unión, la selectividad y las recuperaciones que se obtienen con este MIP de piridincarbinol son superiores a las de aquellos MIP que se obtienen con la plantilla más compleja de enamina. Así, la invención proporciona un MIP sorprendentemente eficaz que comprende una plantilla sencilla que carece de ciertos rasgos clave de la diana pero que proporciona unión eficaz con aquellas nitrosaminas diana que contienen el resto piridina-metanol.

#### Preparación de MIP para NNAL

25 Usando el monómero funcional de ácido metacrílico (MAA), cualquiera de los dos reticuladores, dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) o trimetacrilato de trimetilopropano (TRIM) y cualquiera de los dos análogos de NNAL, 4-(metilpropenil-amino)-1-piridin-3-il-butan-1-ol (4MPAPB, Fig 4A) o piridincarbinol (Fig 4B) como plantillas, se obtienen dos polímeros diferentes que exhiben ambos fuertes afinidad y selectividad para NNAL en medios disolventes orgánicos y acuosos.

30 Esta invención incluye un procedimiento de extracción para la recuperación cuantitativa del análogo de nicotina NNAL que supone las etapas de preparación de un MIP selectivo para NNAL en un formato de material cromatográfico, acondicionamiento de la columna, aplicación de una muestra de orina, retirada de los compuestos que interfieren y finalmente elución selectiva del analito de NNAL.

35 A manera de explicación y no de limitación, la invención se describirá adicionalmente con más detalle con referencia a una serie de ejemplos. La invención se refiere a moléculas de plantilla, materiales polímeros diseñados para que se unan a nitrosaminas que se derivan de nicotina y están presentes en sistemas orgánicos o acuosos, y finalmente al uso de dichos materiales, por ejemplo, en separaciones analíticas o preparativas, en cromatografía, para pretratamiento de muestra analítica, y en sensores químicos.

A menos que se describa otra cosa, los materiales están disponibles comercialmente o se pueden preparar mediante técnicas convencionales. Véanse, por ejemplo, B. Sellergren (Ed.) Molecularly-imprinted Polymers: Man made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry, parte de la serie Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Elsevier Science, Amsterdam, Países Bajos, 2001.

#### 40 Ejemplo 1: Síntesis de plantilla de enamina (MPAPB)

Se añadieron 2 ml de tolueno anhidro (secado recientemente sobre sodio) a un vial que contenía 4-metilamina-1-(3-

piridil)-1-butanol (100 ml). Se añadieron a esto 500 mg de tamiz molecular secado recientemente. Se agitó la mezcla durante 1 hora bajo N<sub>2</sub>. A la mezcla se añadieron 100 µl de propionaldehído. La mezcla se agitó a 55°C durante 4 horas. La reacción se vigiló mediante HPLC después de 1,5 horas. El color del producto era anaranjado-amarillo en tolueno. El producto bruto en tolueno se usó directamente para la síntesis del MIP tras filtración sin purificación. El rendimiento de plantilla de MPAPB fue de alrededor de 90%.

### Ejemplo 2: Síntesis de MIP usando piridincarbinol como plantilla

A piridina metanol (97 µl) se añadieron 3,74 ml de TRIM purificado (que se ha purificado sobre alúmina básica), monómero funcional de MAA (1020 µl), disolvente porógeno de tolueno (7,1 ml) y finalmente iniciador de ABDV (63 mg) y se agitó hasta que se obtuvo una disolución transparente. Se transfirió la disolución a un vial de vidrio, se purgó con nitrógeno durante 5 minutos y se cerró a la llama. Se llevó a cabo una polimerización inducida por calor a 45°C durante 24 horas. A continuación se curó la mezcla de polímeros a 70°C durante 24 horas más.

El procesamiento del material de MIP bruto fue como sigue: el MIP se trituró gruesamente y se transfirió a un cartucho de Soxhlet. Se lavó a fondo en primer lugar con metanol durante 12 horas y a continuación con ácido acético durante 12 horas a fin de retirar cualquier resto de plantilla y otros monómeros sin reaccionar. Tras estas primeras etapas de extracción, el polímero se secó al vacío y luego se molió y se tamizó en un polvo fino dentro de un intervalo de tamaño de 20 a 90 µm. Como etapa final de extracción, el MIP finamente molido se sometió a una extracción con disolvente asistida por microondas de 40 minutos usando ácido fórmico como disolución de extracción. Después de secar, el MIP estaba listo para usar.

### Ejemplo 3: Uso de MIP como sorbentes selectivos en SPE

En una realización de la invención, el MIP se puede empaquetar en columnas de extracción en fase sólida para la extracción selectiva de NNAL desde una matriz biológica. En primer lugar, se colocó una frita de polipropileno en una columna de SPE apropiada (típicamente 10 ml de capacidad para usos analíticos), se añadieron a continuación 25 mg de MIP en la parte superior para formar un lecho de MIP y una segunda frita se comprimió firmemente sobre la superficie del lecho de MIP. El acondicionamiento de la columna se llevó a cabo en el orden siguiente: se añadieron a la MIPSPE 1 ml de DCM, 1 ml de MeOH y finalmente 1 ml de agua destilada.

Se dejó pasar la muestra, por ejemplo, orina humana (5 ml) que contenía cantidades bajas del analito, a través de la columna de MIPSPE acondicionada. A continuación se sometió la columna a vacío para retirar el agua hasta que se secó el material. A continuación, se eluyeron las sustancias polares, que interferían y que se podían haber asociado no específicamente con el MIP, mediante un lavado con 1 ml de agua destilada. Se realizó otra vez una etapa de secado que aplica varios minutos de vacío para facilitar el denominado cambio de fase (cambio de medio de acuoso a orgánico). En este punto, las sustancias no polares que interfieren se retiraron mediante lavados con 1 ml cada vez de tolueno, tolueno:DCM (9:1) y tolueno:DCM (4:1). La elución selectiva final de NNAL se llevó a cabo en etapas de elución de 3 veces, cada una de 1 ml de DCM.

Tras la evaporación del disolvente, se reconstituyeron las muestras en la fase móvil y se analizaron sobre un sistema de HPLC: por ejemplo Merck-Hitachi (sistema L-7000) usando una columna beta-básica C18, 5 µm, 150x2,1 mm + precolumna 10x2,1 mm. El caudal fue de 0,25 ml/min, volumen de inyección 100 µl, temperatura 30°C y detección a 262 nm UV. La fase móvil consiste en NH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 3, ácido octanosulfónico 5 mM y metanol al 20%.

En estas condiciones se obtuvo NNAL como un pico doble claramente distinguible que se eluye a los 8-10 minutos aproximadamente (véase la Figura 6, en la que se compara una muestra de orina humana de 1 ml a la que se ha añadido 0,25 µg de NNAL con orina exenta de NNAL). El pico doble es característico de NNAL porque corresponde a sus dos rotámeros. A partir de la estructura de NNAL, se puede demostrar que la cadena lateral sobre el anillo de piridina puede tener diferentes estados conformacionales. Las conformaciones preferidas se denominan rotámeros y para NNAL hay dos conformaciones principales. La retención de estos dos rotámeros sobre una columna de HPLC ha de diferir. Como se muestra en la Figura 6, el pico de NNAL se separa limpiamente de las sustancias que interfieren. Por lo tanto se puede cuantificar con facilidad y precisión. Las tasas de recuperación para NNAL (definidas como cantidad recuperada/cantidad cargada x 100) son típicamente hasta 90%, dependiendo de los niveles iniciales de NNAL en la muestra biológica. Se han observado tasas de recuperación de cerca de 100% con muestras que contenían 50 pg/ml y 500 pg/ml de NNAL (Figura 5).

### Ejemplo 4: Uso de MIP como sorbentes selectivos en SPE en presencia de nicotina

Otra aplicación de la invención es el uso del MIP como sorbente selectivo para NNAL en el que hay presentes altos niveles de nicotina. Esto ilustra el amplio alcance de las aplicaciones del material de MIP y cómo la naturaleza selectiva del MIP se puede adaptar finamente para muestras particulares.

Se prepararon columnas de SPE como se describe en el Ejemplo 3. El acondicionamiento de la columna de SPE se llevó a cabo en el orden siguiente: 1 ml de DCM seguido por 1 ml de MeOH seguido por 1 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 4,5. La muestra, en este ejemplo 5 ml de orina humana que contenía pequeñas cantidades de analito, se dejó pasar

a través de la columna de MIPSPE acondicionada. A continuación se sometió la columna a un vacío suave (por ejemplo, 10-80 kPa) para retirar el agua hasta que el material estuvo seco. Se eluyeron las sustancias polares que interferían y que se podían haber asociado no específicamente con el MIP, mediante un lavado con 1 ml de  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 4,5. Se realizó otra etapa de secado de varios minutos de vacío suave. Posteriormente, se realizaron lavados con 1 ml cada vez de tolueno, tolueno:DCM (9:1) y tolueno:DCM (4:1) en este orden. La elución selectiva final de NNAL se llevó a cabo en 3 etapas de elución cada una de 1 ml de DCM.

Tras la evaporación del disolvente, se reconstituyeron las muestras en la fase móvil y se analizaron sobre un sistema de HPLC similar al que se ha descrito en el Ejemplo 3. Un cromatograma de ejemplo se muestra en la Figura 7, que ilustra cómo se retiene selectivamente el NNAL sobre el MIP mientras que la nicotina se retira en el lavado con tampón.

#### Ejemplo 5: Artículos para fumar que incorporan MIP

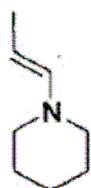
Con referencia a los dibujos, las Figuras 8 y 9 ilustran artículos para fumar en forma de cigarrillos que tienen un cilindro 1 de tabaco encajado en una envoltura 2 unida a un filtro para el humo 3 por medio de un papel de la punta 4. Para aclaración, el papel de la punta 4 se muestra con un espaciado de separación de la envoltura 2, pero en realidad se situarán en estrecho contacto.

En la Figura 8, el filtro para el humo 3 comprende tres elementos de filtro cilíndricos 3a, 3b, 3c. El primer elemento de filtro 3a en el extremo de la boca del filtro es de 7 mm de longitud, está compuesto de estopa de acetato de celulosa impregnada con 7% en peso de plastificante de triacetina que tiene una caída de presión manométrica de 25 mm de columna de agua sobre su longitud. El segundo elemento de filtro 3b, posicionado centralmente es una cavidad de 5 mm de longitud que contiene 150 mg de gránulos de carbón activado. El tercer elemento de filtro 3c adyacente al cilindro 1 es de 15 mm de longitud, tiene una caída de presión manométrica de 90 mm de columna de agua sobre su longitud, y comprende 80 mg de estopa de acetato de celulosa. La estopa está impregnada con 4% en peso de triacetina y tiene 80 mg de MIP específico para nitrosaminas volátiles, producido como se describe en el Ejemplo 6 a continuación, distribuido uniformemente en todo su volumen al estilo "Dálmata".

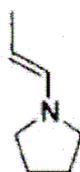
El cigarrillo que se muestra en la Figura 9 es similar al de la Figura 8 excepto que el filtro para el humo 3 tiene cuatro elementos de filtro coaxiales, cilíndricos 3a, 3b, 3c y 3d. El primer elemento de filtro 3a en el extremo de la boca del cigarrillo es de 5 mm de longitud, y está compuesto de estopa de acetato de celulosa impregnada con 7% en peso de plastificante de triacetina. El segundo elemento de filtro 3b, posicionado adyacente al primer elemento de filtro 3a es una cavidad de 5 mm de longitud que contiene 200 mg de polímero impreso molecularmente específico para nitrosaminas volátiles, producido como se describe en el Ejemplo 6 a continuación. El tercer elemento de filtro 3c adyacente al segundo elemento de filtro 3b es de 10 mm de longitud y comprende estopa de acetato de celulosa impregnada con 7% en peso de triacetina. El cuarto elemento de filtro 3d se sitúa después del tercer elemento del filtro 3c, es de 7 mm de longitud y comprende 80 mg de carbón activado granular. Se forma un anillo de orificios de ventilación 5 en el papel de la punta 4 en un plano radial A-A que proporciona aire al tercer elemento de filtro 3c aproximadamente 3 mm corriente abajo del empalme con el cuarto elemento de filtro 3d cuando se inhala el humo a través del cigarrillo.

Los siguientes Ejemplos ilustran adicionalmente este aspecto de la invención.

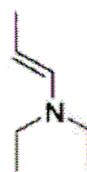
#### Ejemplo 6: Análogos de plantillas para nitrosaminas volátiles



p.e. = 99-102°C  
(10,0 kPa)



p.e. = 92-96°C  
(9,3 kPa)



p.e. = 35°C  
(2,0 kPa)

Se disuelven dos equivalentes de una amina secundaria apropiada, por ejemplo, dimetilamina, dietilamina, pirrolidina, piperidina o morfolina, en éter anhidro y se añaden tamices moleculares secados recientemente (50 g/mol de amina). A continuación se enfría la mezcla a -5°C y se agita. A continuación se añade gota a gota un equivalente de propionaldehído a la mezcla fría, manteniendo la temperatura a  $0 \pm 5^\circ\text{C}$ . Se deja la mezcla en reposo en un baño

frío toda la noche y luego se filtra. Se obtiene el producto, con un rendimiento de aproximadamente 50%, mediante destilación del filtrado a presión reducida, dependiendo del punto de ebullición del producto. A modo de ejemplo, en la Figura 10 se muestran estructuras y puntos de ebullición. (Véase, Brannock, y col., J. Org. Chem., 1964, 29, 801-812).

5 Usando un monómero funcional de ácido fuerte, se protona la enamina, creando así la necesaria interacción no covalente durante la etapa de impresión. La carga positiva reside en el átomo de carbono unido al nitrógeno, una estructura estabilizada debido a la deslocalización para dar un ión iminio. Esto posiciona correctamente los monómeros funcionales ácidos para el reconocimiento posterior de las nitrosaminas volátiles. Como no hay oportunidad de deslocalizar la carga positiva, la protonación del nitrógeno de la enamina está desfavorecida. (Véase, Cook, y col., J. Org. Chem., 1995, 60, 3169-3171).

10 Puede que se prefiera usar un monómero funcional ácido más fuerte que MAA. Realizaciones adicionales incorporan ácido 4-vinilbenzoico o ácido 4-vinilbenceno sulfónico como monómeros funcionales.

#### **Ejemplo 7: Síntesis de un MIP usando una enamina como plantilla**

15 Se prepara una disolución de prepolimerización disolviendo la enamina deseada (1 mmol), un monómero funcional ácido (4 mmol), un monómero reticulador (20 mmol) y un iniciador de radicales libres (1% peso/peso del total de monómeros) en un disolvente porógeno apropiado. El monómero funcional es indistintamente MAA o ácido trifluorometacrílico (TFMAA), el reticulador es indistintamente EDMA o TRIM, el iniciador de radicales libres es ABDV y el disolvente porógeno es uno entre cloroformo, tolueno, acetonitrilo o acetonitrilo/tolueno (1/1 v/v). La disolución se transfiere a un recipiente de polimerización, se enfría a 0°C y se purga a continuación con N<sub>2</sub> durante 5 minutos, tras lo cual, se cierra a la llama el recipiente. La polimerización se inicia a 45°C y se deja que continúe a esta temperatura durante 24 horas. A continuación, se cura el polímero a 70°C durante 24 horas más.

20 A continuación se procesa el material de MIP bruto. Se tritura gruesamente el MIP y se transfiere a un cartucho de Soxhlet. A continuación se extrae a fondo (i) con metanol durante 12 horas e (ii) con ácido acético durante 12 horas, a fin de retirar la molécula de plantilla y los monómeros que no han reaccionado. Tras estas primeras etapas de extracción, el polímero se seca al vacío, se muele y se tamiza para dar partículas del intervalo de tamaño deseado, por ejemplo, 25-36 µm. A continuación, el MIP molido finamente se somete a una etapa final de extracción, que implica 40 minutos de extracción asistida por microondas usando ácido fórmico como disolvente de extracción. A continuación el MIP se seca al vacío durante 24 horas

25 Como alternativa, se puede usar la TSNA diana en lugar de la enamina. Los puntos de ebullición de nitrosaminas volátiles seleccionadas a presión atmosférica normal se muestran en la Figura 11.

#### **Ejemplo 8: Uso del material de MIP del Ejemplo 2 y/o del Ejemplo 7 en el tratamiento de extractos de tabaco**

El polímero producido en conformidad con el procedimiento del Ejemplo 2 o del Ejemplo 7 se incorpora a una columna de extracción en fase sólida, y se acondiciona la columna haciendo pasar a través de ella diclorometano (DCM), metanol y finalmente agua destilada.

35 Se extrae hoja de tabaco Shredded Burley con agua durante 15 minutos a 60°C. Se separa el tabaco de la disolución por filtración y se seca. Se hace pasar la disolución a través de la columna y se deja que adsorba TSNA del extracto. A continuación, se drena la columna y se concentra la disolución por evaporación en película y a continuación, el concentrado se recombina con el tabaco extraído y se seca al aire.

La TSNA adsorbida por el polímero se puede eluir de la columna usando DCM.

#### **Ejemplo 9: Uso del material de MIP del Ejemplo 2 o del Ejemplo 7 en el tratamiento de extractos de tabaco**

40 Se extrae hoja de tabaco picada, curada en atmósfera artificial, con agua durante 15 minutos a 60°C. Se separa el tabaco de la disolución por filtración y se seca. La disolución se mezcla con el MIP del Ejemplo 2 o del Ejemplo 7, período durante el que el polímero adsorbe selectivamente las TSNA de la disolución. A continuación, el MIP se separa mecánicamente del extracto por filtración o por centrifugación. Se concentra la disolución por evaporación; a continuación, el concentrado se recombina con el tabaco extraído y se seca al aire.

45 El MIP se puede regenerar mediante elución con DCM, metanol y finalmente agua desionizada o tampón de pH 4, para reutilización.

#### **Ejemplo 10: Uso del material de MIP del Ejemplo 2 o del Ejemplo 7 en el tratamiento de extractos de tabaco**

50 Usando un procedimiento continuo de extracción, se carga hoja de tabaco picada de tipo mezcla US a una primera cámara de extracción a la que se alimenta dióxido de carbono supercrítico. Después de que haya estado en contacto con el tabaco, el dióxido de carbono se alimenta a una segunda cámara de extracción que contiene un MIP producido según se describe en el Ejemplo 2 o en el Ejemplo 7. El dióxido de carbono, que ha estado en contacto con el polímero, se hace volver a la primera cámara de extracción y se pone otra vez en contacto con el tabaco. Se

continúa el procedimiento cíclico hasta que el contenido en TSNA del tabaco se haya reducido al nivel deseado, momento en el que el dióxido de carbono se expulsa del sistema, y el tabaco se retira de la primera cámara. El MIP en la segunda cámara se regenera a continuación usando DCM, metanol y ácido acético.

5 **Ejemplo 11: Uso del material de polímero impreso molecularmente desarrollado para 4-metilnitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL), en el tratamiento de una disolución que contiene NNAL y nicotina**

El polímero producido en conformidad con el procedimiento del Ejemplo 2 se incorporó a una columna de extracción en fase sólida, y se acondicionó la columna haciendo pasar a través de ella disolución tampón de fosfato.

10 Se prepararon disoluciones patrón acuosas de NNAL y nicotina en tampones de fosfato en un intervalo de pH de 3,0 - 7,5. La disolución patrón tamponada se hizo pasar a través de la columna, se recogió esta fracción y se analizó en cuanto a su contenido en NNAL y nicotina. Una disolución de lavado tamponada se hizo pasar a través de la columna, esta fracción también se recogió y se analizó en cuanto a su contenido en NNAL y nicotina.

Se analizaron las disoluciones por HPLC con detección UV. Las condiciones óptimas para que el MIP retenga NNAL y recupere nicotina se observaron en el intervalo de pH 4,0 - 4,5. A valores de pH inferiores la nicotina se protona y tiene poca interacción con el polímero, de modo que se arrastra con el tampón acuoso.

15 **Ejemplo 12: Uso del material de MIP desarrollado para 4-metilnitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL), en el tratamiento de una disolución que contiene NNAL y TSNA**

El polímero producido en conformidad con el procedimiento del Ejemplo 2 se incorpora a una columna de extracción en fase sólida, y se acondicionó la columna haciendo pasar a través de ella diclorometano (DCM), metanol y finalmente agua destilada.

20 Se acidificaron disoluciones patrón acuosas de NNAL y varias TSNA (NAB, NAT, NNK y NNN) con ácido acético glacial a pH 3. La disolución patrón se hizo pasar a través de la columna, a lo que siguieron tres lavados con disolución de ácido acético glacial, se analizó esta fracción respecto a su contenido en NNAL y TSNA por GC-TEA. Se hicieron pasar a través de la columna tres lavados de diclorometano, esta fracción también se analizó respecto al contenido en NNAL y TSNA.

25 El MIP retuvo 91% de NNAL, 65% de NNK y tuvo una eficacia de aproximadamente 20-30% para las otras TSNA (menos similares estructuralmente).

30 La descripción anterior se ha expuesto meramente para ilustrar la invención y no tiene la intención de ser limitante. Dado que a los expertos en la técnica se les pueden ocurrir modificaciones de las realizaciones descritas que incorporen el espíritu y la esencia de la invención, se debería interpretar la invención de modo que incluya todo aquello que esté dentro del alcance de las reivindicaciones que se adjuntan y equivalentes de las mismas.

## REIVINDICACIONES

1. Un polímero impreso molecularmente selectivo al menos para una nitrosamina específica de tabaco, en el que dicho polímero impreso molecularmente se obtiene usando como plantilla un análogo funcional o estructural de una nitrosamina específica de tabaco.
- 5 2. Un polímero impreso molecularmente según la reivindicación 1, en el que dicha al menos una nitrosamina se deriva de nicotina, normicotina, anabasina o anatabina.
3. Un polímero impreso molecularmente según la reivindicación 1, selectivo para la nitrosamina NNAL derivada de nicotina.
- 10 4. Un polímero impreso molecularmente según la reivindicación 1, en el que el polímero se ha preparado usando como plantilla un análogo isostérico de una nitrosamina de nicotina.
5. Un polímero impreso molecularmente según la reivindicación 1, en el que el polímero se ha preparado usando como plantilla 4-(metilpropenil-amino)-1-piridin-3-il-butan-1-ol.
6. Un polímero impreso molecularmente según la reivindicación 1, en el que el polímero se ha preparado usando como plantilla piridincarbinol.
- 15 7. Un polímero impreso molecularmente según la reivindicación 1, en el que el polímero se ha preparado usando un compuesto que incluye una subestructura de la nitrosamina específica de tabaco.
8. Un kit que comprende:
  - un polímero impreso molecularmente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7; e
  - instrucciones de uso del polímero impreso molecularmente para que realice al menos una de las acciones de detectar, cuantificar, y separar nitrosaminas en una muestra.
- 20 9. Un procedimiento para preparar un polímero impreso molecularmente, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:
  - copolimerizar al menos un monómero funcional y al menos un reticulador en presencia de al menos un análogo funcional o estructural de una nitrosamina específica de tabaco en un medio de polimerización que contiene al menos un iniciador de radicales libres para producir un polímero impreso molecularmente unido a un análogo funcional o estructural de una nitrosamina específica de tabaco; y
  - 25 retirar dicho análogo funcional o estructural de una nitrosamina específica de tabaco del polímero impreso molecularmente.
10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que el monómero funcional exhibe funcionalidad de ácido.
- 30 11. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que el monómero funcional se selecciona entre el grupo que consiste en ácido metacrílico (MAA), TFMAA, ácido vinilbenzoico, y ácido itacónico.
12. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que el reticulador se selecciona entre el grupo que consiste en dimetacrilato de etilenglicol (EDMA), trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM) y tetraacrilato de pentaeritrol.
- 35 13. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que el análogo estructural se selecciona entre el grupo que consiste en 4-(metilpropenil-amino)-1-piridin-3-il-butan-1-ol (4MPAPB) y piridincarbinol.
14. Un procedimiento para preparar un polímero impreso molecularmente, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:
  - copolimerizar una mezcla de polimerización y al menos un análogo funcional o estructural de una nitrosamina específica de tabaco en un medio de reacción homogéneo; y
  - 40 recuperar las partículas suspendidas del medio de reacción.
15. Un procedimiento para preparar un polímero impreso molecularmente, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:
  - copolimerizar una mezcla de polimerización y al menos un análogo funcional o estructural de una nitrosamina específica de tabaco en un medio de reacción heterogéneo; y
  - 45 recuperar el material polimerizado del medio de reacción heterogéneo.

16. Un procedimiento para determinar si un producto de tabaco contiene nitrosaminas, que comprende:
- hacer que reaccione la muestra con un polímero impreso molecularmente, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en condiciones que permitan que se unan las nitrosaminas presentes en la muestra al polímero impreso molecularmente; y
- 5 evaluar si el polímero impreso molecularmente se ha unido a algunas nitrosaminas, en el que la evaluación que da como resultado la observación del polímero impreso molecularmente unido a nitrosaminas indica que la muestra contiene nitrosaminas.
17. Un procedimiento para cuantificar la cantidad de nitrosaminas en un producto de tabaco, que comprende:
- hacer que reaccione la muestra con un polímero impreso molecularmente, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en condiciones que permitan que se unan las nitrosaminas presentes en la muestra al polímero impreso molecularmente; y
- 10 medir la cantidad de nitrosaminas unidas al polímero impreso molecularmente.
18. Un procedimiento para tratar un producto de tabaco para reducir el nivel de un componente del mismo que se considera diana que comprende tratar el producto de tabaco con un polímero impreso molecularmente, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 15 19. Un procedimiento según la reivindicación 18, en el que el producto de tabaco se produce por descomposición térmica de un material que contiene tabaco, un sustituto de tabaco o una mezcla de los mismos.
20. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que el producto de tabaco se produce calentando el material a una temperatura por debajo de su temperatura de combustión.
- 20 21. Un procedimiento según la reivindicación 19 o la 20, en el que el producto de tabaco se produce por combustión del material.
22. Un procedimiento según la reivindicación 18, en el que el producto de tabaco se produce poniendo en contacto un material que contiene tabaco, un sustituto de tabaco o una mezcla de los mismos con un disolvente.
23. Un procedimiento para fabricar un material de tabaco, que comprende las etapas de:
- 25 extraer un material que contiene tabaco, sustituto de tabaco o una mezcla de los mismos con un disolvente;
- poner en contacto el extracto con un polímero impreso molecularmente, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, de modo que reduzca el nivel de un compuesto que se considera diana en el extracto, y combinar el extracto tratado con el material de tabaco extraído.
24. Un artículo para fumar, que comprende:
- 30 un material para fumar; y
- un polímero impreso molecularmente, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, selectivo al menos para una nitrosamina específica de tabaco que se encuentra en los productos de descomposición térmica del material para fumar.
- 35 25. Un artículo para fumar, según la reivindicación 24, en el que el polímero impreso molecularmente es selectivo al menos para una nitrosamina volátil que se encuentra en la fase vapor de los productos de descomposición térmica del material para fumar.
26. Un filtro para el humo, que comprende un polímero impreso molecularmente, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 40 27. Un filtro para el humo según la reivindicación 26, en el que el polímero impreso molecularmente es selectivo al menos para una nitrosamina volátil que se encuentra en la fase vapor de los productos de descomposición térmica de tabaco o de un sustituto de tabaco.

SÍNTESIS

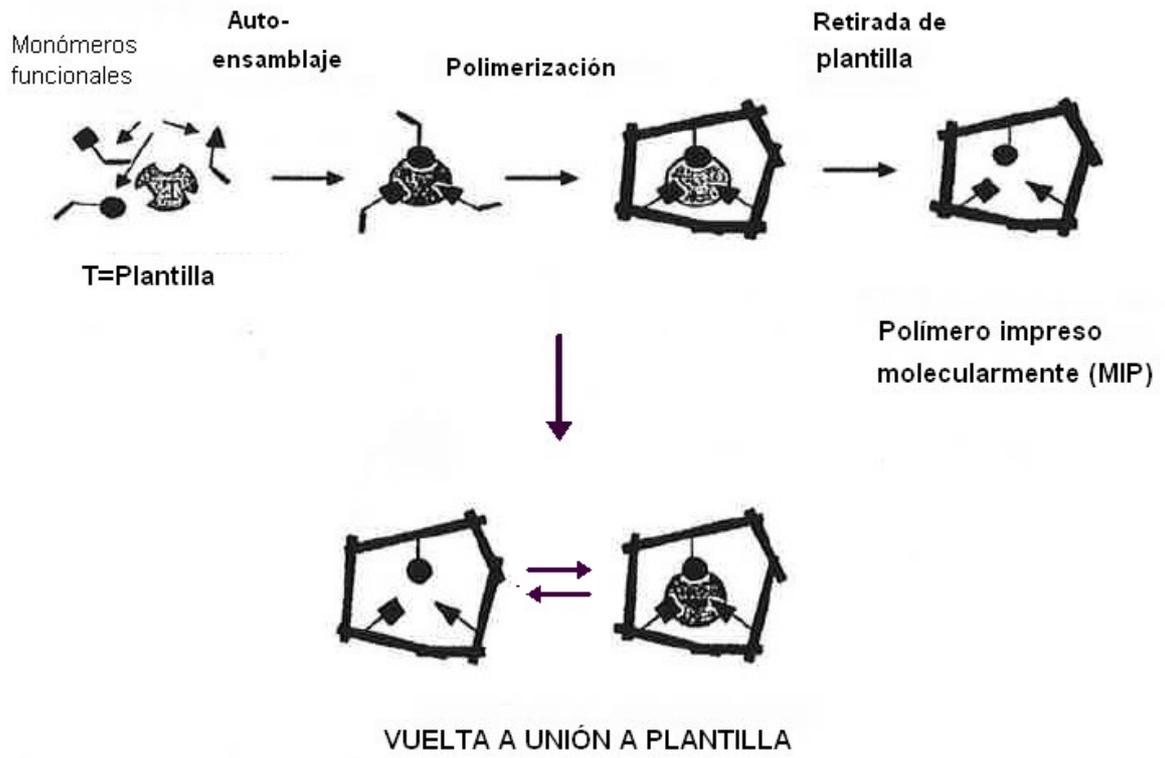
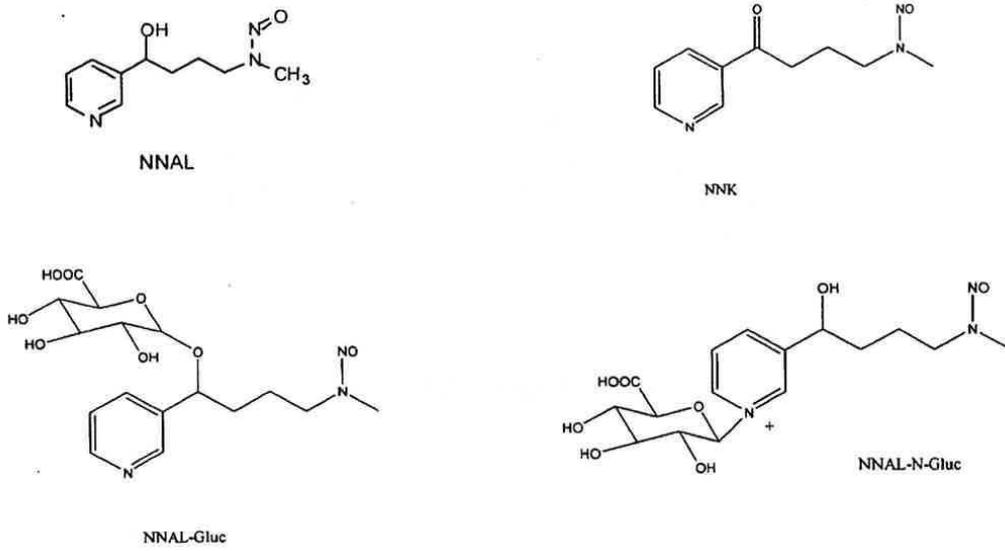
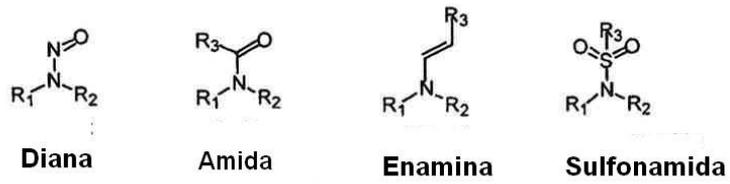


Figura 1



**Figura 2**



**Figura 3**

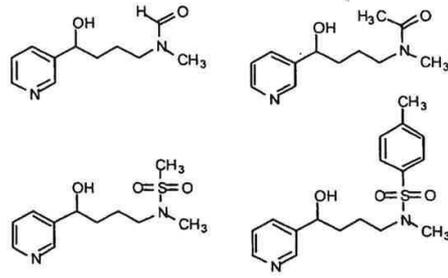


Figura 4A

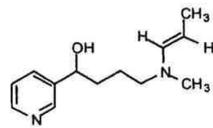


Figura 4B



Figura 4C

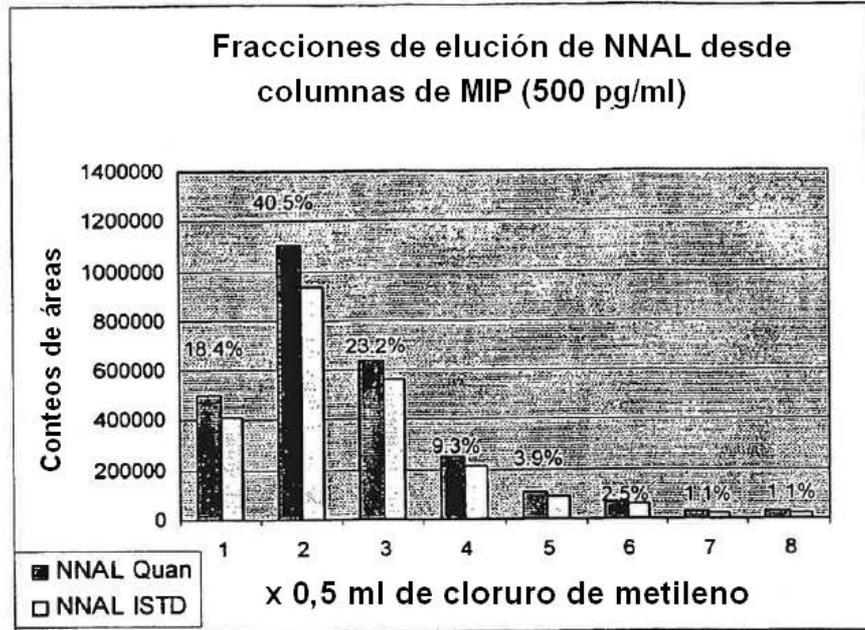


Figura 5A

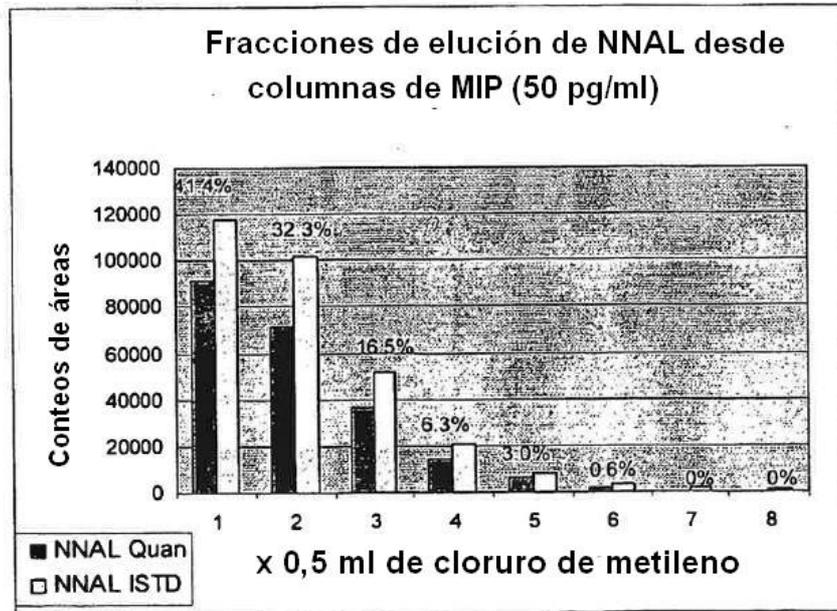


Figura 5B

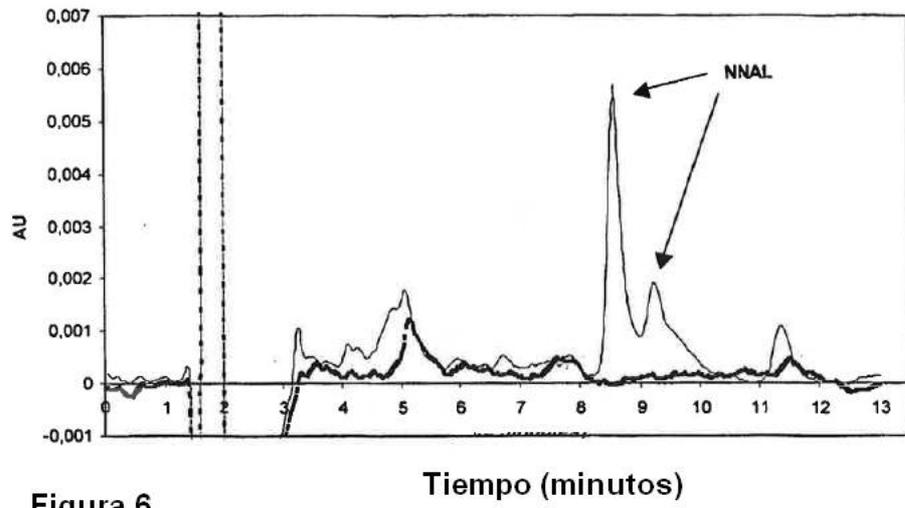


Figura 6

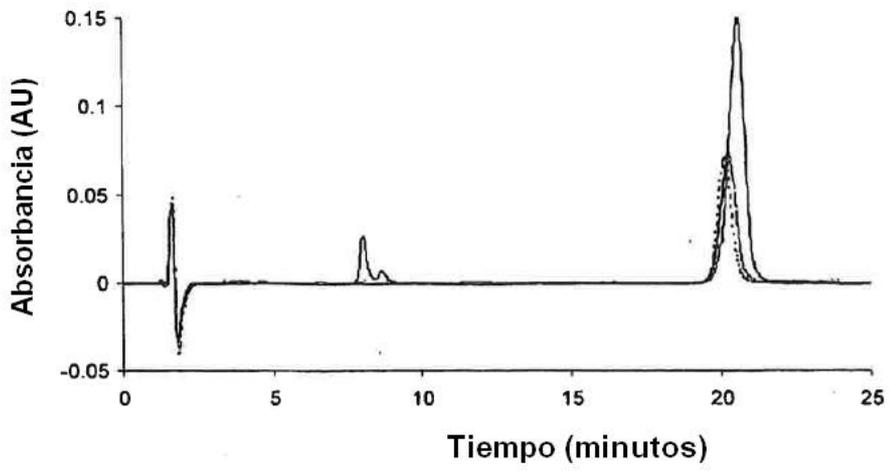


Figura 7

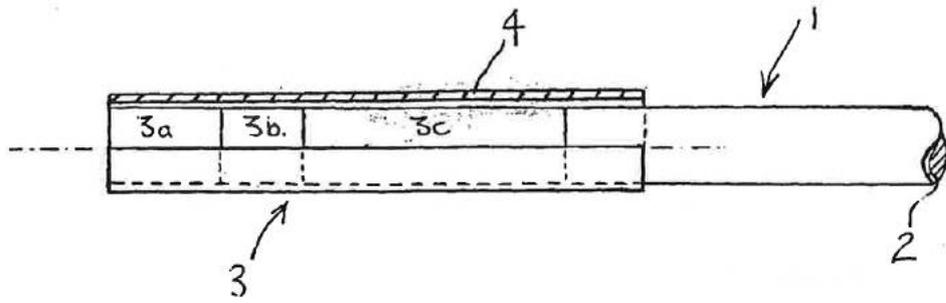


Figura 8

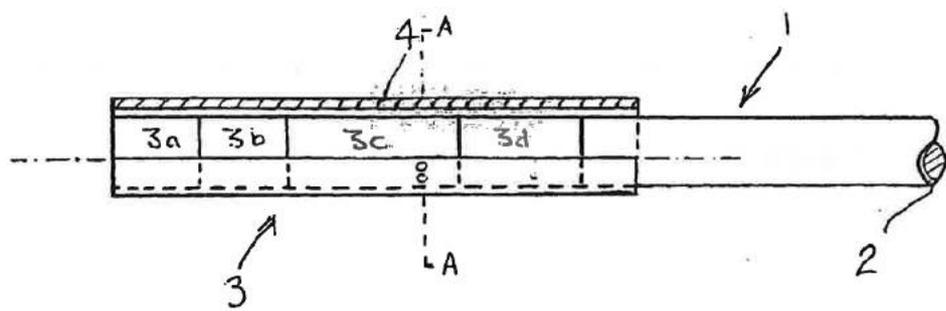
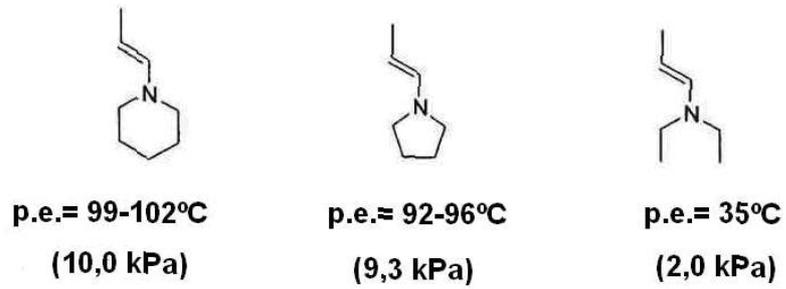
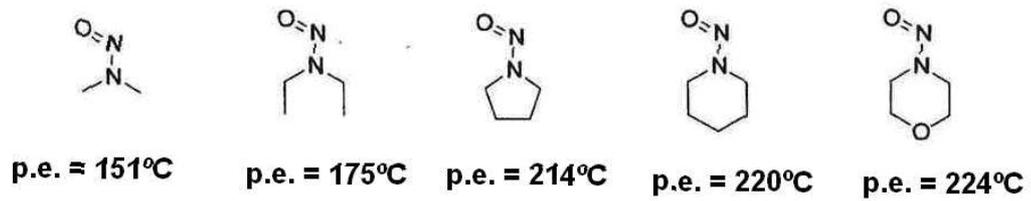


Figura 9



**Figura 10**



**Figura 11**