

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 933**

51 Int. Cl.:

**A24B 15/30** (2006.01)

**A24D 3/14** (2006.01)

**A24B 15/24** (2006.01)

**B01J 20/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2007 E 07847322 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2094119**

54 Título: **Polímeros de impresión molecular selectivos para las nitrosaminas específicas del tabaco y sus procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**07.12.2006 SE 0602625**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.06.2016**

73 Titular/es:

**BRITISH AMERICAN TOBACCO (INVESTMENTS)  
LIMITED (100.0%)  
GLOBE HOUSE 1 WATER STREET  
LONDON GREATER LONDON WC2R 3LA, GB**

72 Inventor/es:

**REES, ANTHONY;  
BILLING, JOHAN y  
YILMAZ, ECEVIT**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 573 933 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 de impresión molecular selectivos para las nitrosaminas específicas del tabaco y sus procedimientos de uso

### Campo de la invención

- 5 En general, la presente invención se refiere a polímeros de impresión molecular y al uso de los polímeros en el bioanálisis y la separación de los metabolitos de la nicotina. Más específicamente, la invención se refiere a polímeros de impresión molecular que tienen especificidad por las nitrosaminas específicas del tabaco e incluye métodos de uso de los polímeros para tratar el tabaco, los sustitutos del tabaco y sus derivados, a fin de reducir el nivel de compuestos diana en el mismo.

### 10 Antecedentes de la invención

En los campos de las ciencias médica, nutricional, ambiental y química existe una creciente necesidad de una separación selectiva de determinadas sustancias de mezclas complejas de sustancias relacionadas. El objetivo puede ser la extracción cuantitativa de un determinado compuesto o compuestos, la medición de su concentración o la eliminación selectiva de un determinado compuesto de una mezcla multicomponentes.

- 15 Los controles más estrictos de salud han aumentado la demanda de métodos que permitan cuantificar sensible y selectivamente productos peligrosos y metabolitos de ciertas sustancias de uso diario generalizado. De particular preocupación son los compuestos químicos relacionados con el uso de productos a base de tabaco, donde dichos compuestos están originalmente presentes en la hoja de tabaco crudo o se generan durante el proceso de fumar. Los compuestos nitroso, como las nitrosaminas, se consideran de especial importancia en este sentido.
- 20 Con el objetivo de reducir la aparición de los peligros relacionados con el hábito de fumar, se han producido ciertos productos farmacéuticos que contienen sólo la sustancia neuroactiva, nicotina, la sustancia reivindicada como la responsable de los aspectos de dependencia del material fumable.

- Entre las formulaciones de nicotina destinadas al tratamiento para dejar de fumar, la goma de mascar de nicotina ha encontrado el uso más generalizado. El control de calidad necesario durante la producción incluye controlar los niveles de nicotina, así como controlar los productos de oxidación principales de la nicotina: cotinina, miosmina, nicotina-cis-N-óxido, nicotina-trans-N-óxido y beta-nicotirina. También es deseable, si no necesaria, la cuantificación de nornicotina, anatabina y anabasina. Se necesitan en el área mejores métodos y materiales para dicho control y dicha cuantificación. El uso de estos sustitutos del cigarrillo puede hacer que se produzcan metabolitos nitrosamina de la nicotina in vivo por procesos metabólicos naturales durante la permanencia de la nicotina en los tejidos corporales. Los niveles de estos metabolitos permanecen por debajo de las concentraciones a las cuales se puede llevar a cabo la mayoría de los procedimientos analíticos de manera cuantitativa. Por lo tanto además de métodos y materiales para utilizar durante la fabricación del producto, siguen siendo necesarias mejores formas de controlar los bajos niveles de los metabolitos de la nicotina in vivo.

- 35 Junto con las necesidades sentidas en relación con productos más nuevos, los productos tradicionales de tabaco también requieren métodos y materiales para cuantificar, reducir o eliminar componentes del tabaco o el humo del tabaco. Dichos componentes incluyen las nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA) y sus precursores alcaloides: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona ("NNK"), 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)butanal ("NNA"), N-nitrosornicotina ("NNN"), N-nitrosoanabasina ("NAB"), N-nitrosoanatabina ("NAT"), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol ("NNAL"), 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)-1-butanol ("iso-NNAL") y ácido 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)butanoico ("iso-NNAC").

- 40 Para cuantificar adecuadamente la cantidad de dichos compuestos presentes en líquidos biológicos humanos, se están desarrollando métodos para analizar los alcaloides, especialmente los productos de descomposición y metabolitos nitrosilados del tabaco. Los métodos de separación cromatográfica o de extracción existentes utilizados para este análisis, carecen de la robustez, la sensibilidad y la velocidad necesarias para manejar la gran cantidad de muestras generadas cuando se hace una detección sistemática de la población en general. Con los métodos existentes, la baja concentración de nitrosaminas, presentes habitualmente en picogramos por mililitro, exige una preparación de la muestra extensa con extracciones de múltiples pasos y a menudo derivatización química (por ejemplo deuteración antes de espectrometría de masas) del analito antes del análisis. Una razón para esta complejidad es que los materiales para separación existentes no son selectivos como podría ser, por ejemplo, un anticuerpo o receptor biológico para los metabolitos en cuestión, sino que más bien dependen de las propiedades fisicoquímicas como carga o hidrofobicidad de los metabolitos para el comportamiento de separación. Estas propiedades fisicoquímicas pueden ser compartidas por muchas otras moléculas irrelevantes en la muestra. Un método rápido y simple para el análisis de las TSNA es por lo tanto una importante necesidad médica analítica insatisfecha.

En los últimos años han aparecido numerosos informes de reconocimiento selectivo de moléculas pequeñas con materiales preparados por impresión molecular (polímeros de impresión molecular o MIP). Los MIP son polímeros que tienen sitios reactivos adaptados para unirse selectivamente a compuestos diana. Se han utilizado materiales de impresión molecular preparados de manera no covalente para el reconocimiento quiral de diversas moléculas pequeñas como medicamentos, azúcares, bases nucleotídicas y pesticidas así como esteroides y hormonas peptídicas. La elevada afinidad y selectividad por el analito diana que presentan algunos de los materiales impresos han justificado una comparación con las fases de inmovilización (IA) correspondientes. En contraste con las fases recién mencionadas, sin embargo, los materiales MIP son sencillos de preparar, estables en la mayoría de los medios y reutilizables durante largos períodos de tiempo. Las aplicaciones de los materiales MIP en cromatografía, separación (continua o por lotes), detección química o en ensayos específicos están, por lo tanto, en investigación.

Otra aplicación es la extracción en fase sólida (SPE) de analitos presentes en bajas concentraciones en muestras biológicas o en matrices complejas. La extracción en fase sólida puede conducir al enriquecimiento selectivo y la depuración de un analito hasta niveles no alcanzables con los métodos existentes. Las extracciones en fase sólida con polímeros de impresión molecular (MISPE) han sido utilizadas en bioanálisis, análisis de alimentos y análisis ambientales. En estos ejemplos se obtiene el enriquecimiento selectivo y la depuración del analito lo que resulta en mayor precisión y reducción del límite de detección (LOD) en la posterior cuantificación cromatográfica (por ej. HPLC) o por espectrometría de masas.

En vista de su elevada selectividad combinada con una buena afinidad por la molécula diana o un grupo de moléculas diana, los MIP han atraído un considerable interés de la industria alimentaria como una herramienta para mejorar la calidad de los alimentos. Esto requiere el uso de un MIP para la eliminación selectiva de componentes no deseados de la matriz alimentaria. Puesto que estos componentes están a menudo presentes en bajas concentraciones, la capacidad de saturación del MIP no es por lo general un factor limitante.

Según WO 05/112670, que está específicamente incorporada por referencia en el presente documento, se puede preferir tener un material MIP capaz de absorber selectivamente los derivados de la nicotina nitrosilados más comunes, de matrices complejas como la orina, obteniéndose una recuperación cuantitativa y por lo tanto errores bajos en la estimación de las concentraciones de sustancias químicas. Los ejemplos de WO 05/112670 se limitan a los MIP preparados empleando como plantilla monómeros ácidos o muy ácidos como ácido metacrílico (MAA), ácido trifluorometacrílico (TFMAA), ácido 4-vinilbenzoico y ácido 4-vinilbencenosulfónico. Además de la cuantificación también es bien conocido el intento de reducir los efectos nocivos del consumo de material que contiene tabaco y sustitutos del tabaco o sus mezclas, reduciendo los niveles de compuestos diana. Dichas reducciones se pueden hacer en el propio material o en uno de sus derivados como un extracto del material. La reducción también se puede efectuar en los productos de la descomposición térmica del material, es decir, el humo inhalado por el fumador y el humo ambiental obtenidos por combustión, o los aerosoles producidos calentando el material a una temperatura por debajo de su temperatura de combustión. Un método bien conocido para este tipo de reducción es poner en contacto los productos de la descomposición térmica del material con un filtro que adsorba los componentes no deseados de los mismos. Un método alternativo consiste en la extracción con solvente del material, por ejemplo según se da a conocer en la memoria de la patente de Estados Unidos US-5601097. Según dicha memoria, el contenido de proteína del material de tabaco se reduce al tratar el tabaco con una solución que contiene un surfactante para extraer polipéptidos, separar la solución, extraer el surfactante y los polipéptidos de la solución y recombinar la solución con el material de tabaco. La memoria de la patente internacional WO 01/65954 da a conocer un proceso en el cual el tabaco se pone en contacto con un líquido supercrítico para extracción como dióxido de carbono supercrítico para reducir o eliminar selectivamente las nitrosaminas.

Estos procedimientos son igualmente aplicables al tabaco en sí mismo y a los sustitutos del tabaco, es decir, materiales naturales o sintéticos con características similares a las del tabaco natural que habilitan que se puedan consumir de una manera similar al tabaco, ya sea fumándolos, mascándolos, inhalándolos o de otra manera.

Ha habido un intento de eliminar la nicotina del humo del tabaco empleando MIP, como se informó en Liu, Y., et al., Molecularly imprinted Solid-Phase Extraction Sorbent for Removal of Nicotine from Tobacco Smoke, Analytical Letters, Vol. 36, No. 8, pp 1631-1645 (2003). El MIP descrito en el artículo fue diseñado para unirse a la nicotina y no a los metabolitos de la nicotina más tóxicos como las nitrosaminas. No está claro si el MIP fue de hecho selectivo para la nicotina puesto que el método científico que producía los datos carecía de elementos clave de verificación del control. Como se describe en WO 05/112670, los MIP selectivos para las TSNA se pueden utilizar para tratar productos del tabaco y así reducir los niveles de uno o más compuestos nitroso de los productos del tabaco. Tales MIP encuentran además uso en el análisis y la cuantificación de las TSNA in vivo, habitualmente en relación con el consumo de productos del tabaco, y en la preparación y la evaluación de productos distintos del tabaco. Por consiguiente, a pesar de los avances sigue siendo una necesidad en el área contar con nuevos MIP y métodos para emplear los mismos en el campo de la nicotina y los metabolitos de la nicotina.

**Resumen de la invención**

La presente invención satisface las necesidades del área al proporcionar MIP únicos que son particularmente selectivos para los compuestos nitroso.

5 Los MIP de la invención se pueden obtener copolimerizando uno o más monómeros funcionales neutros y un reticulante hidrófobo en presencia de un análogo estructural de una nitrosamina, en un medio de polimerización que contenga un iniciador de radicales libres, después de lo cual se separa la plantilla del MIP.

La invención incluye el uso de los MIP para extracciones analíticas y preparativas, en cromatografía, para el tratamiento previo de la muestra analítica, en sensores químicos o como un filtro de fase sólida para la extracción de las TSNA de sustancias o dispositivos que contienen nicotina.

10 Según una realización, se proporciona un polímero de impresión molecular selectivo para al menos una nitrosamina específica del tabaco (TSNA), donde el polímero se preparó empleando materiales que contenían una TSNA o un análogo estructural de la misma, un monómero funcional neutro y un reticulante hidrófobo. El análogo estructural de una TSNA podría ser un análogo enamina de una TSNA o un análogo sulfonamida de una TSNA o un análogo amida de una TSNA, por ejemplo, un análogo formamida de una TSNA. El monómero funcional neutro se podría elegir del grupo que consiste en metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), acrilamida, metacrilamida, monoacrilato de glicerol y monometacrilato de glicerol. El reticulante hidrófobo se podría elegir del grupo que consiste en dimetacrilato de etilenglicol (EDMA), trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM) y divinilbenceno (DVB). En la realización de la invención, el polímero podría ser selectivo para NNK, NNA, NNN, NAB, NAT, NNAL, iso-NNAL o iso-NNAC.

20 Según otra realización de la invención, se proporciona un artículo para fumar, que comprende un material para fumar y un polímero de impresión molecular de acuerdo con la realización descrita previamente.

Según otra realización de la invención, un filtro de humo puede contener un polímero de impresión molecular de acuerdo con lo anterior.

25 Según otra realización de la invención, un kit puede estar compuesto por un polímero de impresión molecular de acuerdo con lo anterior e indicaciones de uso de los polímeros de impresión molecular para realizar al menos de: la detección, la cuantificación o la separación de nitrosaminas en una muestra.

30 Según otra realización de la invención, se proporciona un método para preparar un polímero de impresión molecular selectivo para las TSNA, que comprende copolimerizar al menos un monómero funcional neutro y al menos un reticulante hidrófobo en presencia de al menos un análogo estructural de TSNA en un medio de polimerización que contenga al menos un iniciador de radicales libres para producir un polímero de impresión molecular unido a un análogo estructural de TSNA y separar el análogo estructural de TSNA del polímero de impresión molecular.

35 Según otra realización de la invención, se proporciona un método para reducir el nivel de al menos una TSNA en un producto del tabaco, que comprende tratar el producto del tabaco con un polímero de impresión molecular según la invención. El producto del tabaco se podría producir por descomposición térmica de un material que contenga tabaco, un sustituto del tabaco o una de sus mezclas, por ejemplo, calentando el material a una temperatura por debajo de su temperatura de combustión, por combustión del material o poniendo en contacto un material que contenga tabaco, un sustituto del tabaco o una de sus mezclas con un solvente.

40 Según otra realización de la invención se proporciona un método para fabricar un material de tabaco, que comprende los pasos de tratar un material que contiene tabaco, un sustituto del tabaco o una de sus mezclas con un solvente para producir un extracto, poner en contacto el extracto con un polímero de impresión molecular según la invención con el fin de reducir su nivel en el extracto y combinar el extracto tratado con el material de tabaco extraído.

45 En esta memoria, "producto del tabaco" significa un material que contiene tabaco (que incluye hoja de tabaco o tallos de tabaco), o un sustituto del tabaco, o una mezcla de tabaco y sustitutos del tabaco, y los derivados de dicho material, incluidos los extractos del material, el humo producido por la descomposición térmica del material y los aerosoles producidos al calentar el material por debajo de su temperatura de combustión.

50 Cuando el producto del tabaco es un derivado producido por la descomposición térmica del material que contiene tabaco o un sustituto del 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, de conformidad con un proceso utilizado en algunos productos alternativos del tabaco conocidos, para producir un aerosol que es inhalado por el consumidor.

Alternativamente, el producto del tabaco puede ser un derivado producido poniendo en contacto un material que contiene tabaco o un sustituto del tabaco con un solvente. En particular, la invención proporciona un método de

fabricación de un material para fumar que comprende los pasos de extraer el material fumable con un solvente, tratar el extracto con un MIP selectivo para al menos un compuesto nitroso a fin de reducir su nivel en el extracto y combinar el extracto tratado con el material fumable.

5 En este proceso, el material fumable puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo hebras finas, tallos, trocitos, láminas cortadas, tallos triturados o cualquiera de sus combinaciones. El solvente puede ser acuoso o no acuoso como metanol, etanol o un medio de extracción de líquido supercrítico, como dióxido de carbono supercrítico líquido. La extracción se puede llevar a cabo bajo cualquier condición que favorezca la extracción del tabaco de compuestos que contienen nitrógeno.

10 La invención también incluye un artículo para fumar compuesto por tabaco o un sustituto del tabaco y un MIP selectivo para la eliminación de al menos un compuesto nitroso a partir de la descomposición térmica de uno de sus productos.

15 El artículo para fumar de la invención puede adoptar cualquier forma convencional, por ejemplo un cigarrillo, habano o purito. En particular el artículo para fumar puede consistir en una barra de material para fumar opcionalmente en una envoltura, con o sin un filtro. La envoltura puede ser de papel, hoja de tabaco, tabaco reconstituido o un sustituto del tabaco. Alternativamente, cuando, por ejemplo, el artículo para fumar está diseñado para producir bajas emisiones de humo ambiental o menores niveles de productos de pirólisis en el humo que inhala el usuario, la envoltura puede estar compuesta por material inorgánico no combustible como un material cerámico. El filtro puede ser de cualquier material adecuado, por ejemplo acetato de celulosa fibrosa, polipropileno o polietileno, o papel.

20 El material para fumar es preferentemente tabaco pero puede ser un sustituto del tabaco por ejemplo un material para fumar que no sea tabaco. Los ejemplos de materiales para fumar que no son tabaco, son materiales vegetales secados y curados que incluyen materiales frutales y un material sintético para fumar como el que se puede producir a partir de alginatos y una sustancia generadora de aerosol 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 de sus mezclas, que incluyen láminas o tallos curados al aire, curados al fuego, curados con aire caliente o curados al sol y pueden haber sido procesados utilizando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, el tabaco se puede cortar, triturar, expandir o reconstituir. El material para fumar también puede incluir aditivos convencionales, como mejorantes, colorantes, humectantes (como glicerol y propilenglicol), rellenos inertes (como tiza) y aromatizantes (como azúcar, regaliz y cacao).

25 La invención también se puede aplicar al tabaco destinado al consumo oral o nasal por aspiración, masticación o ingestión nasal, en lugar de fumarlo. Dichos productos incluyen tabaco de mascar, rapé y snus.

30 El MIP se puede incorporar en el material fumable. En consecuencia, la invención incluye un material para fumar que contiene un MIP selectivo para la eliminación de al menos una nitrosamina específica del tabaco, de los productos de la descomposición térmica del material fumable. Alternativamente, cuando el artículo para fumar consiste en una barra de material fumable en una envoltura, el MIP se puede incorporar en la envoltura. Por lo tanto, la invención incluye un material de envoltura de artículos para fumar que contiene un polímero de impresión molecular selectivo para la eliminación de un componente diana de los productos de la descomposición térmica de un material para fumar. La envoltura puede ser de un material a base de celulosa como un papel o un material a base de tabaco como tabaco reconstituido.

35 Los artículos para fumar preferidos de la invención son los cigarrillos, compuestos por una barra de tabaco, una envoltura y un filtro que incluyen un MIP selectivo para la eliminación de al menos una nitrosamina específica del tabaco, de los productos de la descomposición térmica de un material fumable.

40 La invención también incluye un filtro de humo que contiene un MIP selectivo para la eliminación de al menos una nitrosamina específica del tabaco, de los productos de la descomposición térmica del material para fumar. El filtro de humo se puede producir por separado del artículo para fumar, por ejemplo en forma de un cigarrillo o una boquilla, o puede estar integrado en el artículo para fumar, por ejemplo en forma de un cigarrillo con una punta de filtro.

45 Los filtros de humo en forma de puntas de filtro pueden tener cualquier construcción convencional. Por ejemplo un filtro tipo "dálmeta" que comprende una sección de material de filtro fibroso, como acetato de celulosa y el MIP en forma particulada y distribuido en toda la sección. Alternativamente el filtro puede estar en forma de un filtro tipo "cavidad", que comprende varias secciones en donde el MIP puede estar entre dos secciones adyacentes de material de filtro fibroso. El filtro de humo también puede comprender otros materiales adsorbentes como una resina de intercambio iónico, una zeolita, sílice, alúmina o amberlite.

50 Durante el uso, el humo pasa a través del filtro, el MIP adsorbe y retiene selectivamente los componentes diana del humo y el humo filtrado es suministrado al fumador.

55 Los filtros de humo y artículos para fumar según la invención pueden incluir medios para proteger el MIP del humo, o reducir su exposición a éste, cuando están en uso. Esto se puede lograr de varias maneras diferentes. Por ejemplo

5 el filtro de humo puede comprender un elemento filtrante para adsorber los materiales de la fase vapor o particulada del humo. Dichos elementos filtrantes pueden comprender un adsorbente general como carbón activado, que puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo hebras, partículas, gránulos, tela o papel. El elemento filtrante también puede ser un adsorbente selectivo como una resina de intercambio iónico, una zeolita, sílice, alúmina o amberlite. Los medios para proteger el MIP pueden incluir dos o más de dichos elementos filtrantes de diferentes composiciones, por ejemplo un primer elemento filtrante de acetato de celulosa y un segundo elemento filtrante de carbón activado. La provisión de varios elementos filtrantes en filtros de humo y artículos para fumar es bien conocida, y se pueden utilizar cualquier configuración convencional del filtro y métodos asociados de construcción.

### Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 muestra un esquema del procedimiento para la síntesis de un polímero impreso;  
La figura 2 muestra nitrosaminas específicas del tabaco;  
La figura 3 muestra análogos isostéricos de las nitrosaminas;  
La figura 4A muestra ejemplos de análogos objetivos basados en amidas y sulfonamidas;
- 15 La figura 4B muestra un análogo de la enamina diana (MPAPB) utilizado como plantilla para preparar un MIP para la extracción de NNAL;  
La figura 5 muestra la estructura química del metacrilato de 2-hidroxietilo;  
La figura 6 muestra la estructura química del dimetacrilato de etilenglicol;  
La figura 7 muestra los resultados de la extracción de N-nitrosopiperidina y nicotina donde la plantilla 1 es formamida, la plantilla 2 es enamina y la plantilla 3 es sulfonamida;
- 20 La figura 8 muestra el porcentaje de las TSNA y la nicotina extraídas de la solución acuosa;  
La figura 9 muestra el porcentaje de las TSNA liberadas después de un lavado con agua;  
La figura 10 muestra el porcentaje de las TSNA y la nicotina extraídas de la solución acuosa;  
La figura 11 muestra el porcentaje de las TSNA liberadas después de un lavado con agua;
- 25 La figura 12 muestra el porcentaje de nicotina sin retener después de cinco cargas de la muestra separadas;  
La figura 13 muestra el porcentaje de NNN sin retener después de cinco cargas de la muestra separadas;  
La figura 14 muestra el porcentaje de NNK sin retener después de cinco cargas de la muestra separadas;  
La figura 15 muestra el porcentaje de NAT sin retener después de cinco cargas de la muestra separadas;  
La figura 16 muestra el porcentaje de NAB sin retener después de cinco cargas de la muestra separadas;
- 30 La figura 17 es una vista de un corte transversal con elevación lateral, parcialmente longitudinal y parcialmente separado, de un artículo para fumar con un filtro de humo según la invención; y  
La figura 18 es una vista similar a la de la figura 17 de un artículo para fumar con un filtro de humo alternativo según la invención.

En la figura, características similares se indican como números de referencia.

### 35 Descripción detallada de la invención

La impresión molecular consta habitualmente de los pasos siguientes: (1) un compuesto de plantilla, que puede ser la molécula diana o un análogo estructural de la misma, se deja interaccionar en solución con un monómero o monómeros funcionales elegidos, para formar un complejo de plantilla-monómero; (2) el complejo de plantilla-monómero se copolimeriza con un monómero reticulante lo que resulta en una matriz polimérica que incorpora el compuesto de plantilla; (3) el compuesto de plantilla se extrae de la matriz del polímero para formar un MIP que se puede utilizar para la unión selectiva de la molécula diana.

45 Antes del paso (3), en el que se prepara el MIP como un polímero sólido (o monolito) generalmente se lo parte y tamiza para obtener una fracción del tamaño deseado del material particulado. Cuando se prepara por métodos de polimerización en suspensión o emulsión, dichos partido y tamizado son innecesarios puesto que el tamaño de partícula puede ser controlado dentro de los límites deseados durante el proceso de polimerización. El material

particulado preparado por cualquiera de los métodos mencionados antes se puede empacar en una columna de extracción cromatográfica o de fase sólida, y usar para la separación cromatográfica de la plantilla de los otros componentes de una mezcla, incluidas las moléculas con estructuras o funcionalidades similares.

5 Los sitios reactivos del polímero de impresión molecular expuestos al retirar el compuesto de plantilla, estarán en una configuración estereoquímica apropiada para la reacción con nuevas moléculas de la molécula diana. Como resultado, los polímeros de impresión molecular se pueden utilizar para la unión selectiva de la molécula diana.

10 La ruta 'no covalente' se ha usado ampliamente para generar sitios de unión de impresión molecular. Ésta hace uso del autoensamblaje no covalente del compuesto de plantilla y los monómeros funcionales para formar el complejo de plantilla-monómero, seguido de la polimerización por radicales libres en presencia de un monómero reticulante y finalmente la extracción del compuesto de plantilla. La impresión covalente, en la cual la molécula de plantilla y un monómero o monómeros adecuados se unen covalentemente antes de la polimerización, también se puede llevar a cabo según métodos conocidos. Las propiedades de unión de los MIP formados por cualquiera de los métodos anteriores se pueden examinar mediante una nueva unión de la molécula de plantilla.

15 La polimerización se realiza en presencia de un solvente formador de poros, un porógeno. Para estabilizar las interacciones electrostáticas entre los monómeros funcionales y el compuesto de plantilla, el porógeno se elige a menudo entre los solventes apróticos de baja a moderada polaridad. Los compuestos de plantilla exhiben a menudo solubilidad de moderada a alta en los medios de polimerización y éstos, o sus análogos estructurales, se pueden utilizar por lo tanto directamente en este procedimiento estándar.

20 Si bien es posible utilizar la propia molécula diana como plantilla, se prefiere comúnmente un análogo estructural de la molécula diana porque: (a) la molécula diana puede ser inestable en las condiciones de polimerización, o puede inhibir la polimerización; (b) la molécula diana puede no estar disponible en cantidades suficientes debido a la complejidad de su síntesis o costo, o ambos; (c) la plantilla puede ser insoluble o poco soluble en la mezcla previa a la polimerización; (d) el MIP puede quedar contaminado con bajos niveles de la molécula diana en regiones poco accesibles de la matriz polimérica, que puede drenar del MIP durante el uso; y/o (e) el o los analitos diana pueden representar un riesgo significativo para la salud y no se deben utilizar como plantilla(s). En el caso de los compuestos nitroso, particularmente los compuestos conocidos como TSNA descritos a continuación, a menudo es más conveniente utilizar sus análogos funcionales como compuestos de plantilla. Por ejemplo, derivados sulfonamida, enamina o amida, por ejemplo, formamida de las TSNA pueden ser compuestos de plantilla, véase la figura 2 por ejemplos de los mismos.

30 Cuando el MIP se deriva usando un análogo funcional del compuesto diana, el análogo funcional debe ser isostérico y preferentemente también isoelectrónico con el compuesto diana, o puede contener una subestructura del compuesto diana donde pueden ser probables fuertes interacciones.

35 Según se usa en este documento un "análogo estructural" de una molécula no es idéntico a la molécula original, pero es similar en parte o totalmente a una parte o toda la molécula original en cuanto a la forma molecular, la distribución de los electrones u otras características.

Los compuestos nitroso, particularmente las nitrosaminas, que tienen la fórmula general  $O=N-N(R_1)(R_2)$  están entre los numerosos ingredientes del tabaco y el humo del tabaco que se ha sugerido que tienen un efecto nocivo para el consumidor. Es de interés para la presente invención el grupo de las nitrosaminas que están presentes naturalmente en el tabaco, las TSNA, véase la figura 2.

40 Posibles análogos isostéricos para la unión dirigida a las nitrosaminas se ven en la figura 3. Las moléculas que se muestran son todas derivadas de la amina original y se pueden sintetizar en un solo paso a partir de la amina secundaria y el correspondiente aldehído o cloruro de ácido. Los modelos moleculares de la enamina (Figura 4B) demostraron una buena complementariedad estérica con NNAL.

45 Los MIP descritos en WO 05/112670 muestran resultados prometedores cuando se utilizan para el análisis y la extracción de numerosos metabolitos de la nicotina, de soluciones analíticas, líquidos corporales y materiales del tabaco. Sin embargo, como las TSNA presentan un campo de interés específico y estrecho, la investigación sobre nuevas formas de recuperar estos compuestos de diversos materiales es continua. En ese sentido, se ha evaluado la formación de MIP utilizando nuevos materiales y métodos.

50 El diseño de nuevos MIP comenzó con la elección de una plantilla adecuada. Como se señaló antes, la plantilla imparte selectividad al polímero e idealmente debe ser químicamente estable, fácilmente disponible, fácil de manipular e impartir propiedades de unión selectiva. Como uno de los objetivos de la invención es reducir la exposición humana a las nitrosaminas, éstas no fueron posibles plantillas. En cambio, se pudieron usar formamidas, enaminas y sulfonamidas (véase la figura 2) para reemplazar el grupo nitroso dada su geometría similar y la posesión de una carga negativa parcial en la misma posición.

El monómero, el reticulante y las condiciones de polimerización (p. ej., solvente o porógeno, iniciador y temperatura) también influyen en las propiedades del MIP final. Los monómeros evaluados fueron el monómero ácido MAA así como el monómero neutro metacrilato de 2-hidroxi-etilo (HEMA), véase la figura 5. El reticulante, que finalmente forma el grueso del polímero, también influye en si el polímero es hidrófilo o hidrófobo. Por lo tanto se evaluaron el reticulante PETRA hidrófilo y el EDMA hidrófobo, véase la figura 6. Para la polimerización, se evaluaron tanto la iniciación térmica como fotoquímica. Los experimentos iniciales indicaron que los MIP neutros, hidrófobos, impresos con una enamina o sulfonamida y preparados empleando polimerización UV mostraron resultados sorprendentes. Se llevó a cabo un análisis de seguimiento que incluyó un MIP ácido y uno hidrófilo para comparar, los resultados se resumen a continuación.

A modo de explicación y no limitante, la invención se describirá más detalladamente haciendo referencia a una serie de ejemplos. La invención se refiere a las moléculas de plantilla, a los materiales poliméricos diseñados para unir las TSNA presentes en sistemas orgánicos o acuosos y finalmente al uso de dichos materiales, por ejemplo, en las separaciones analíticas o preparativas, en cromatografía, para el pretratamiento de la muestra analítica y en sensores químicos. A menos que se describa lo contrario, los materiales se pueden adquirir en el comercio o se pueden preparar por técnicas convencionales.

Ejemplo 1: Preparación de los MIP para la evaluación

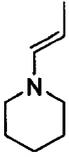
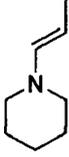
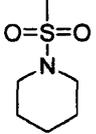
Se prepararon doce MIP diferentes que representan todas las posibles combinaciones de tres plantillas (formamida, enamina y sulfonamida), dos monómeros (ácido y neutro) y dos reticulantes (hidrófilo e hidrófobo). Los MIP se evaluaron empleando una mezcla 1:1 de N-nitrosopiperidina y (-)-nicotina en agua. También se generaron polímeros de referencia no impresos y se evaluaron en condiciones similares. Los resultados se resumen en la figura 7. Ejemplos de la preparación de plantillas de enamina y piperidina carbinol así como una descripción adicional de los métodos que se pueden utilizar para los propósitos de la presente invención se pueden encontrar en WO 05/112670.

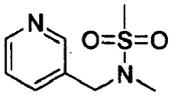
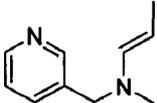
Como resulta evidente de la figura 7, los MIP que utilizan monómeros ácidos se unen a grandes cantidades de nicotina. Para las aplicaciones en las que se descartarán las TSNA mientras que los niveles de nicotina deben permanecer inafectados, entonces, dicho monómero es menos favorecido. Además, es evidente que los MIP con un reticulante hidrófobo son mejores para unirse a las nitrosaminas que los MIP hidrófilos.

Ejemplo 2: Preparación de los MIP para comparación analítica

En vista del rendimiento sorprendentemente positivo de los MIP hidrófobos neutros, como se resume en la figura 7, se eligieron para el análisis posterior los MIP hidrófobos neutros, impresos con plantillas de enamina o sulfonamida y polimerizados usando UV. Para la comparación, también se incluyó en la muestra el MIP hidrófilo de mejor rendimiento. Se prepararon siete MIP utilizando los parámetros resumidos en la tabla 1.

Tabla 1.

Nombre	Plantilla	Monómero	Reticulante
MIP 1		HEMA	EDMA
MIP 2		PETRA	PETRA
MIP 3		HEMA	EDMA
MIP 4	Análogo de NNAL	HEMA	EDMA
MIP 5	Análogo de NNAL	HEMA	EDMA

Nombre	Plantilla	Monómero	Reticulante
MIP 6		HEMA	EDMA
MIP 7		HEMA	EDMA

### Ejemplo 3: Evaluación de los MIP elegidos con mezclas de TSNA/nicotina

Se prepararon columnas de SPE, cada una con 25 mg de los MIP 1-7. A cada columna se le agregó 1 ml de solución acuosa que contenía 0.30 µg/ml de TSNA total y se le añadió 0.2 µg/ml de nicotina. Se utilizó HPLC para determinar la cantidad de TSNA que no había sido extraída de cada columna, tomando en consideración el cálculo del material extraído, véase la figura 8. Se hizo pasar 1 ml de agua a través de cada columna y se determinó la cantidad de TSNA liberada, cuando la hubo, véase la figura 9. Cada una de las figuras 8 y 9 representa el promedio de los dos experimentos

Basado en el fuerte rendimiento de los MIP hidrófobos neutros, la evaluación de los MIP 1 y 3-7 se repitió usando 1 ml de solución de prueba que contenía 0.30 µg/ml de TSNA total y 4 µg/ml de nicotina en tampón de fosfato de pH 6.3 (fuerza iónica 0.09). Los resultados se muestran en las figuras 10 y 11, donde ambos representan un promedio de dos experimentos. Como se puede ver, los MIP, 1, 3 y 4 se comportaron mejor reteniendo el 100% de la TSNA permitiendo simultáneamente que la mayor parte de la nicotina pasara sin trabas.

También se evaluó el rendimiento de los MIP, 1, 3 y 4 a pH 5.3 y 7.3. A medida que aumentó el pH, la retención de nicotina aumentó de aproximadamente 10% a 30%, lo que indica que cuando la nicotina no debe ser afectada, el rendimiento óptimo se alcanza con un pH ligeramente ácido. También se evaluó un MIP ácido formado con el monómero ácido MAA y el reticulante hidrófobo EDMA utilizando las mismas condiciones, a pH 6.3, éste retuvo aproximadamente el 90% de la nicotina.

La regeneración de los MIP se realizó usando TFA al 0.5% en lavado con MeOH. También se pueden usar otras mezclas ácido/alcohol.

### Ejemplo 4: Evaluación de los MIP elegidos con TSNA específicas y nicotina

Después de encontrar el rendimiento sorprendentemente positivo de los MIP, 1, 3 y 4 en los experimentos descritos antes, se llevó a cabo una evaluación adicional. Se prepararon columnas de SPE con 25 mg de MIP molido y se cargaron cinco cargas de solución de prueba, 1 ml cada vez, en las columnas. La solución de prueba tenía aproximadamente 80 ng/ml de cada uno de NNN, NNK, NAT, 40 ng/ml de NAB y 4 µg/ml de nicotina en tampón de fosfato de pH 6.3 (fuerza iónica 0.09). Después de cargar cada muestra la cantidad de nicotina y cada TSNA sin retener se determinó mediante HPLC. También se evaluó un polímero de control no impreso. Los resultados se muestran en las figuras 12-16. Como se ve en las figuras, aproximadamente el 10% de la nicotina se une a los MIP en el primer paso de carga. Esto satura el MIP con nicotina y agregar más muestra en la columna no resulta en una retención más significativa de la nicotina. NNN es la más débilmente unida al MIP y el avance se ve en el segundo paso de la carga. Cada uno de los MIP, 1, 3 y 4 es excelente para retener NNK, NAB y NAT. Por lo tanto, la combinación de monómero funcional neutro, plantilla de enamina o sulfonamida y reticulante hidrófobo, resulta en una sorprendentemente alta retención de TSNA de una muestra mixta reteniendo simultáneamente sólo una mínima cantidad de nicotina.

Dichos MIP son particularmente atractivos para las aplicaciones en las que se deben extraer las TSNA de una muestra pero la nicotina no debe ser afectada, como el tratamiento del tabaco o el humo del tabaco para eliminar las TSNA. Además, dichos MIP se pueden utilizar en una capacidad analítica para medir la cantidad de TSNA en una muestra de un producto o una muestra de un paciente. En tales casos, si la nicotina es un componente de interés se puede cuantificar la cantidad de nicotina retenida por el MIP y se pueden emplear otros métodos, por ejemplo, se pueden utilizar MIP específicos para la nicotina, para cuantificar la cantidad remanente de nicotina en la muestra. El paso siguiente de evaluación de los niveles de nicotina se podría hacer antes o después del uso de los MIP específicos para las TSNA de la presente invención.

### Ejemplo 5: Uso de un MIP de la invención en el tratamiento de extractos de tabaco

El polímero producido según los parámetros descritos antes se puede incorporar en una columna de SPE y la columna se puede acondicionar según sea necesario. Los monómeros neutros funcionales utilizados en el polímero

podrían ser, por ejemplo, HEMA, acrilamida, metacrilamida, N-metacrilamida, monoacrilato de glicerol, monometacrilato de glicerol o 2-(4-vinilfenil)-1,3-propanodiol. Los reticulantes hidrófobos podrían ser, por ejemplo, EDMA, TRIM, DVB, m-diisopropenilbenceno, dimetacrilato de tetrametilenglicol, tetraacrilato de pentaeritritol, N,N'-Metilbisacrilamida, N,N'-Etilenbisacrilamida, N,N'-Butilenbisacrilamida, N,N'-Hexametenbisacrilamida. Se conocen otros materiales aplicables, véase, por ejemplo, *Molecularly Imprinted Material: Science and Technology*, Yan, M; Ramström, O; Eds., Marcel Dekker, Nueva York, 2005.

La hoja de tabaco cortada o triturada se puede extraer con agua durante 15-25 minutos a 60 °C. El tabaco se separa de la solución por filtración y se seca. La solución se pasa a través de la columna de SPE y la TSNA es absorbida del extracto. Después la columna se drena y la solución se concentra por evaporación de la película, el concentrado se recombina luego con el tabaco extraído y secado al aire. El rendimiento del MIP se puede evaluar eluyendo del MIP los compuestos unidos usando 2 x 1 ml de metanol con 0.5% de TFA y analizando el extracto mediante HPLC-UV.

Ejemplo 6: Uso de un MIP de la invención en el tratamiento de extractos de tabaco

Empleando un proceso de extracción continua, se carga hoja de tabaco triturada de tipo mezcla US en una primera cámara de extracción en la cual se introduce dióxido de carbono supercrítico. Después de ponerse en contacto con el tabaco, el dióxido de carbono se introduce en una segunda cámara de extracción que contiene un MIP según la invención. Una vez que hizo contacto con el polímero, el dióxido de carbono se regresa a la primera cámara de extracción y se vuelve a poner en contacto con el tabaco. El proceso cíclico se continúa hasta que el contenido de TSNA en el tabaco se ha reducido al nivel deseado, con lo cual el dióxido de carbono es expulsado del sistema, y el tabaco retirado de la primera cámara. Después se regenera el MIP de la segunda cámara para su reutilización.

Ejemplo 7: Uso de un MIP de la invención para el análisis de la muestra

Se prepara una columna de SPE agregando 25 mg de MIP según la invención. Se agrega una muestra de prueba a la columna, por ejemplo 5 ml de orina humana que potencialmente contiene TSNA. Se permite que la muestra pase a través de la columna, que después podría ser sometida al vacío para eliminar todo el líquido y asegurar que el material del MIP está seco. Se puede realizar un lavado para eliminar cualquier compuesto que interfiera que pueda haber estado asociado no específicamente con el MIP, por ejemplo 1 ml de agua destilada. Después de secar las TSNA se pueden recuperar del MIP usando, por ejemplo, 1 ml de DCM y cuantificar por HPLC.

Ejemplo 8: Uso de un MIP de la invención en artículos para fumar

Con referencia a las ilustraciones, las figuras 17 y 18 ilustran artículos para fumar en forma de cigarrillos con una barrita 1 de tabaco empaquetada en una envoltura 2 unida a un filtro de humo 3 por medio de un papel de boquilla 4. Para mayor claridad, el papel de boquilla 4 se muestra separado de la envoltura 2, pero en la práctica están en estrecho contacto.

En la figura 17, el filtro de humo 3 comprende tres elementos filtrantes cilíndricos 3a, 3b, 3c. El primer elemento filtrante 3a en el extremo de la boca del filtro tiene 7 mm de longitud, está compuesto por fibra de acetato de celulosa impregnada con 7% en peso de plastificante triacetina y tiene una caída de presión de 25 mm de columna de agua en su longitud. El segundo elemento filtrante 3b, colocado centralmente, es una cavidad de 5 mm de longitud que contiene 150 mg de gránulos de carbón activado. El tercer elemento filtrante 3c adyacente a la barrita 1 tiene 15 mm de longitud, una caída de presión de 90 mm de columna de agua en su longitud, y contiene 80 mg de fibra de acetato de celulosa. La fibra está impregnada con 4% en peso de triacetina y tiene 80 mg de MIP específico para TSNA como se describe en este documento, distribuidos uniformemente en todo su volumen en un estilo "Dálmata".

El cigarrillo que se muestra en la figura 18 es similar al de la figura 17, excepto que el filtro de humo 3 tiene cuatro elementos filtrantes cilíndricos coaxiales 3a, 3b, 3c y 3d. El primer elemento filtrante 3a en el extremo de la boca del cigarrillo tiene 5 mm de longitud y está compuesto por fibra de acetato de celulosa impregnada con 7% en peso de plastificante triacetina. El segundo elemento filtrante 3b, colocado adyacente al primer elemento filtrante 3a es una cavidad de 5 mm de longitud que contiene 200 mg de MIP específico para TSNA, producido como se describe en este documento. El tercer elemento filtrante 3c adyacente al segundo elemento filtrante 3b tiene 10 mm de longitud y está compuesto por fibra de acetato de celulosa impregnada con 7% en peso de triacetina. El cuarto elemento filtrante 3d está entre el tercer elemento filtrante 3c, tiene 7 mm de longitud y contiene 80 mg de carbón activado granular. Un anillo de orificios de ventilación 5 está formado en el papel de boquilla 4 en un plano radial A-A que suministra aire al tercer elemento filtrante 3c aproximadamente unos 3 mm de por delante de la unión con el cuarto elemento filtrante 3d cuando se inhala el humo a través del cigarrillo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un polímero de impresión molecular selectivo para al menos una nitrosamina específica del tabaco (TSNA), que ha sido preparado utilizando materiales que comprenden:
  - una TSNA o uno de sus análogos estructurales;
  - 5 un monómero funcional neutro; y
  - un reticulante hidrófobo.
2. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho análogo estructural de una TSNA es un análogo enamina de una TSNA.
3. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho análogo estructural de una TSNA es un análogo amida de una TSNA, como una formamida.
4. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho análogo estructural de una TSNA es un análogo sulfonamida de una TSNA.
5. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho monómero funcional neutro se elige del grupo que consiste en metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), acrilamida, metacrilamida, monoacrilato de glicerol y monometacrilato de glicerol.
6. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho reticulante hidrófobo se elige del grupo que consiste en dimetacrilato de etilenglicol (EDMA), trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM) y divinilbenceno (DVB).
7. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero es selectivo para NNK.
8. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero es selectivo para NNA.
9. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero es selectivo para NNN.
10. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero es selectivo para NAB.
11. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero es selectivo para NAT.
12. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero es selectivo para NNAL.
13. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero es selectivo para iso-NNAL.
14. Un polímero de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polímero es selectivo para iso-NNAC.
15. Un artículo para fumar que comprende:
  - un material para fumar; y
  - un polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14
16. Un filtro de humo, que contiene un polímero según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
17. Un kit, compuesto por:
  - 30 un polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14; e
  - indicaciones de uso del polímero de impresión molecular para realizar al menos una de: la detección, la cuantificación o la separación de nitrosaminas en una muestra.
18. Un método para preparar un polímero de impresión molecular selectivo para las TNSA, que comprende:
  - 35 copolimerizar al menos un monómero funcional neutro y al menos un reticulante hidrófobo en presencia de al menos un análogo estructural de TSNA en un medio de polimerización que contenga al menos un iniciador de radicales libres para producir un polímero de impresión molecular unido a un análogo estructural de TSNA; y
  - separar el análogo estructural de TSNA del polímero de impresión molecular.
19. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el monómero funcional se elige del grupo que consiste en HEMA, acrilamida, metacrilamida, monoacrilato de glicerol y monometacrilato de glicerol.

20. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el reticulante se elige del grupo que consiste en EDMA, TRIM y DVB.
21. Un polímero de impresión molecular producido por el método de cualquiera de las reivindicaciones 18-20.
- 5 22. Un método para reducir el nivel de al menos una TSNA en un producto del tabaco, que comprende tratar el producto del tabaco con un polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14
23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el producto del tabaco es producido por descomposición térmica de un material que contiene tabaco, un sustituto del tabaco o una mezcla de éstos.
24. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el producto del tabaco es producido por calentamiento del material a una temperatura por debajo de su temperatura de combustión.
- 10 25. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el producto del tabaco es producido por combustión del material.
26. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el producto del tabaco es producido poniendo en contacto un material que contiene tabaco, un sustituto del tabaco o una mezcla de éstos con un solvente.
27. Un método de fabricación de un material del tabaco, que comprende los pasos de:
- 15           tratar un material que contiene tabaco, un sustituto del tabaco o una mezcla de éstos con un solvente para producir un extracto;
- poner en contacto el extracto con un polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14 de modo de reducir el nivel de éste en el extracto; y
- combinar el extracto tratado con el material del tabaco extraído.

FIGURA 1

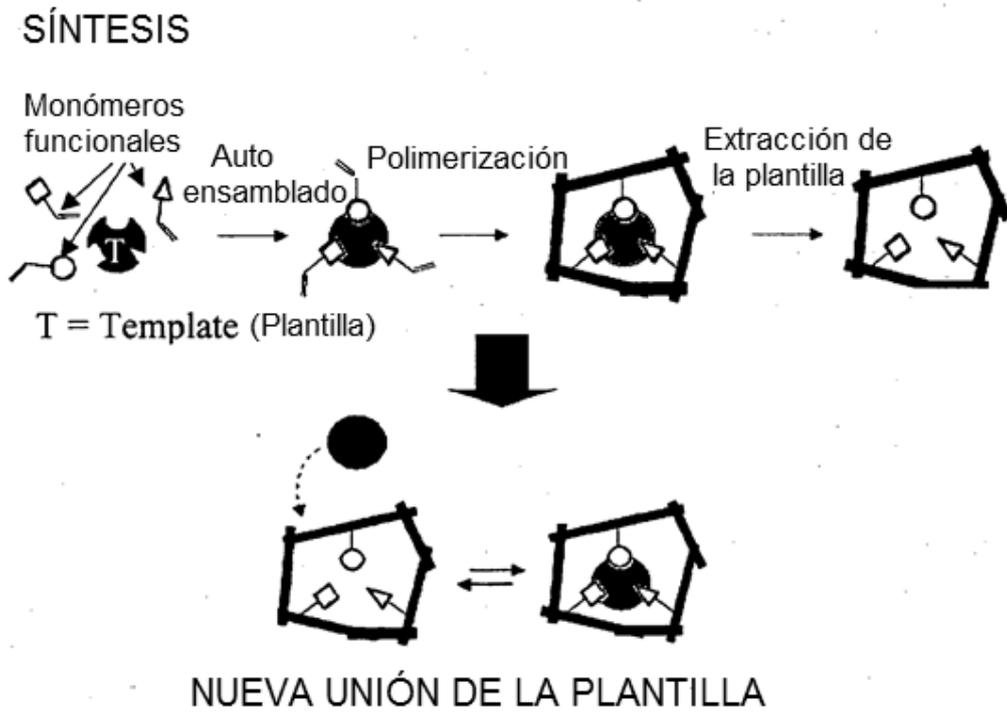


FIGURA 2

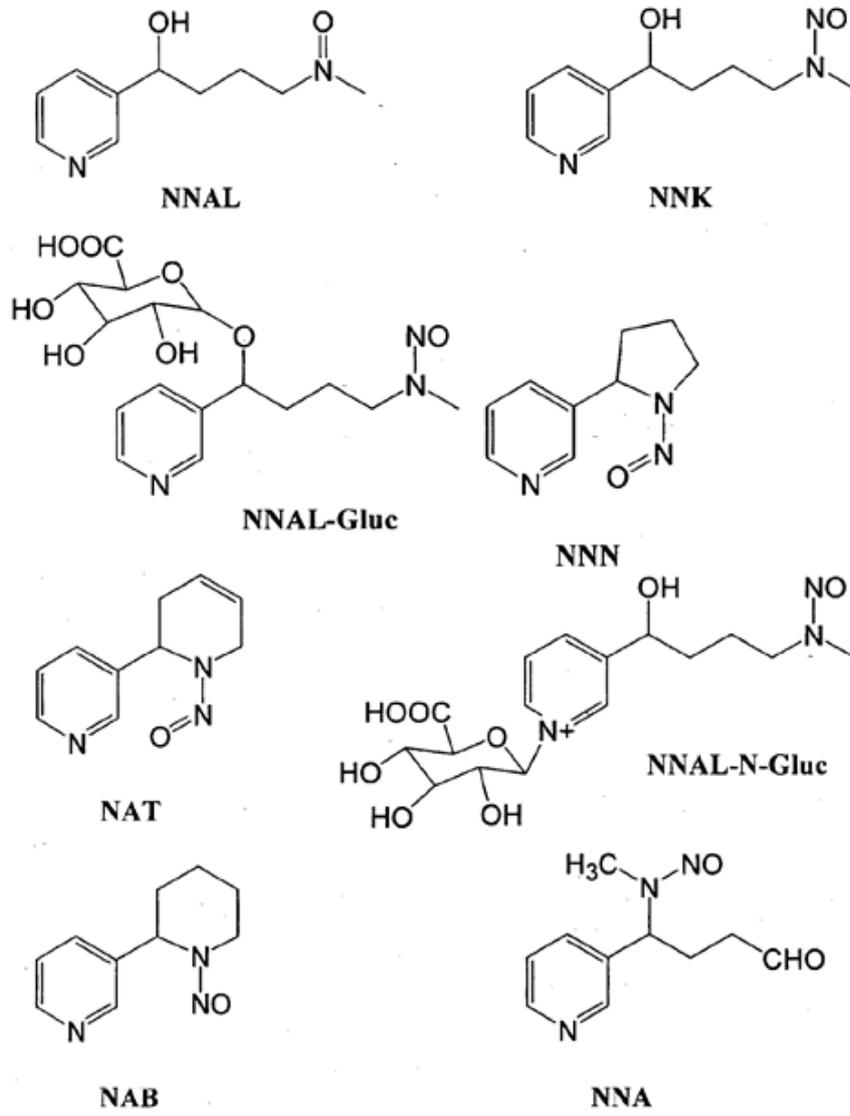


FIGURA 3

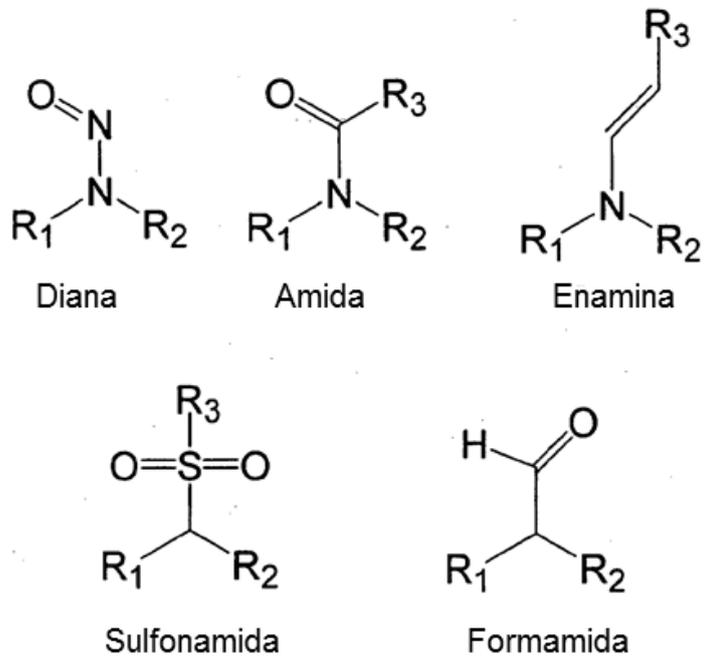


FIGURA 4

Figura 4A

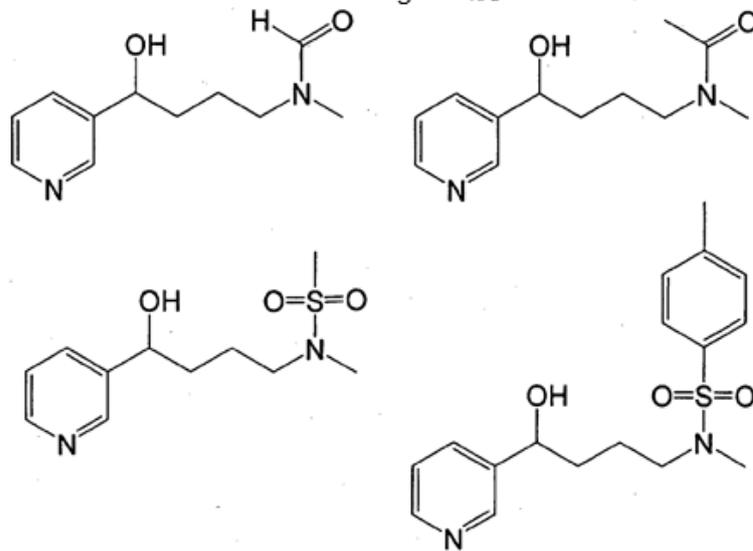


Figura 4B

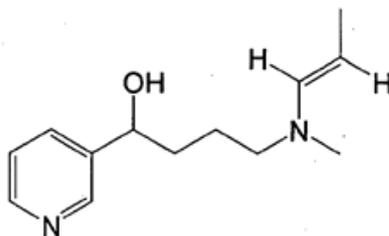
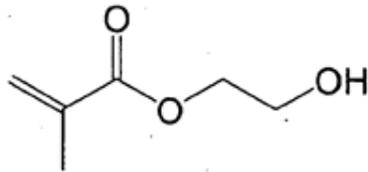
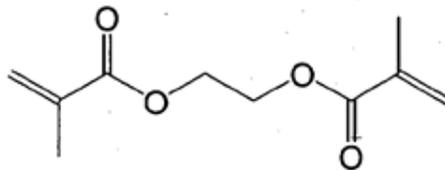


FIGURA 5



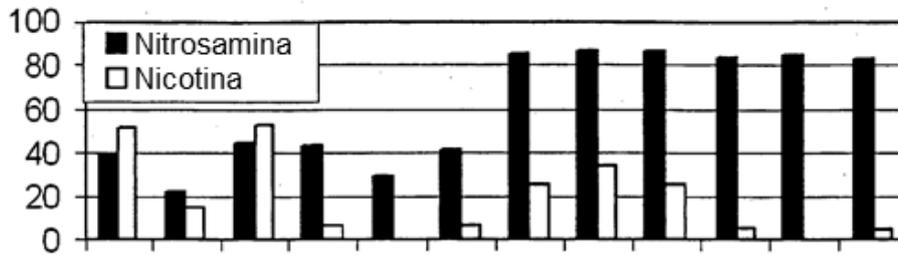
Metacrilato de 2-hidroxietilo  
(HEMA)

FIGURA 6



Dimetacrilato de etilenglicol  
(EDMA)

FIGURA 7



Polímero de referência no impresso

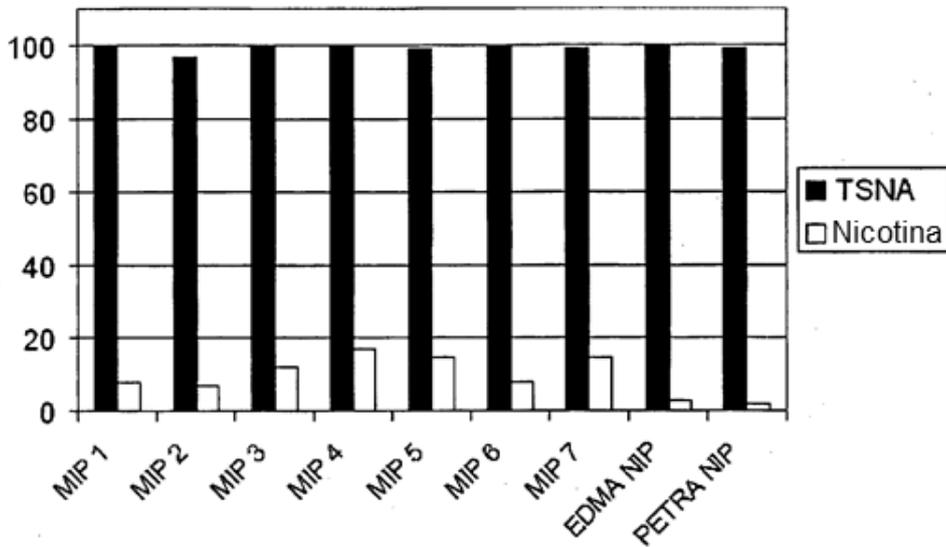
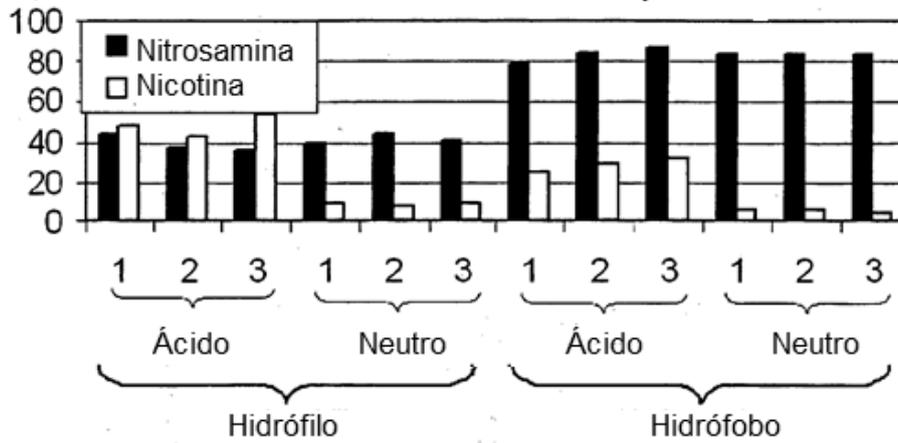


FIGURA 8

FIGURA 9

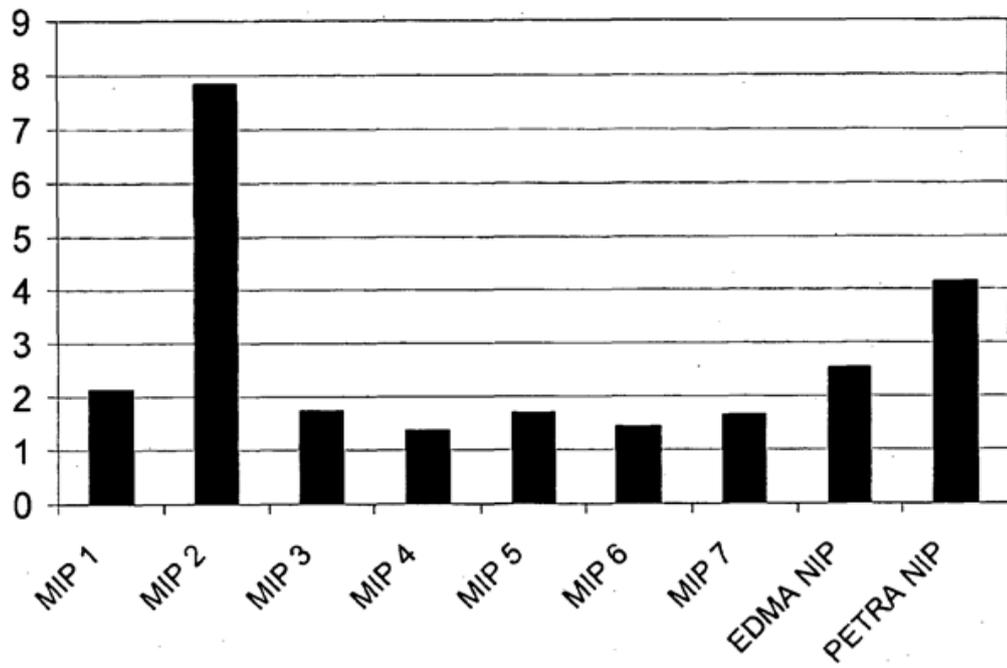


FIGURA 10

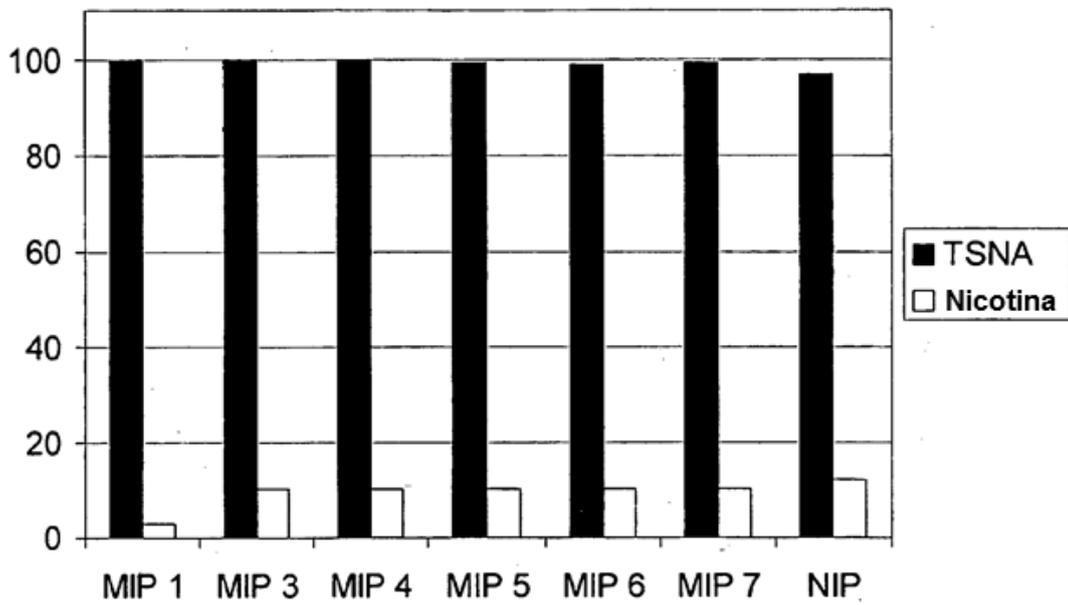


FIGURA 11

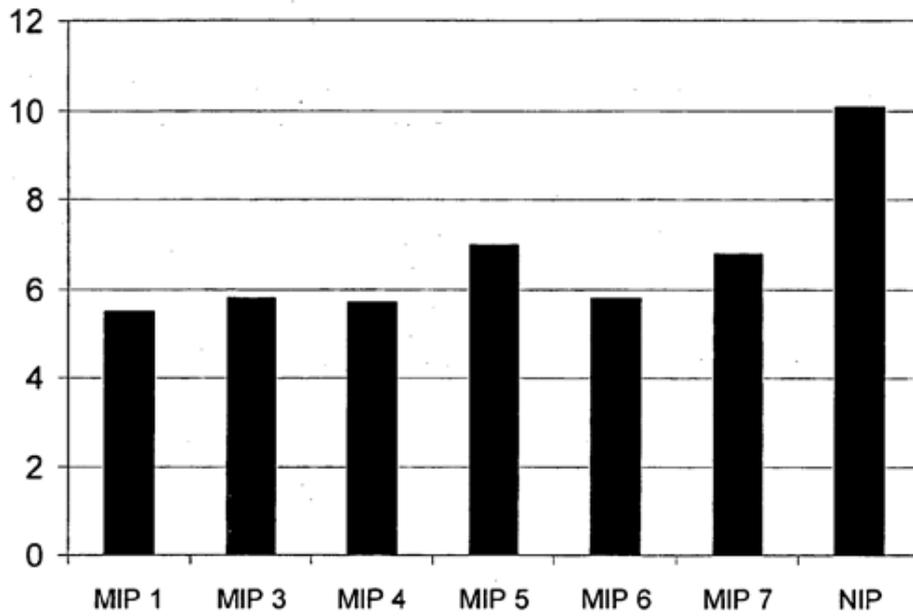


FIGURA 12

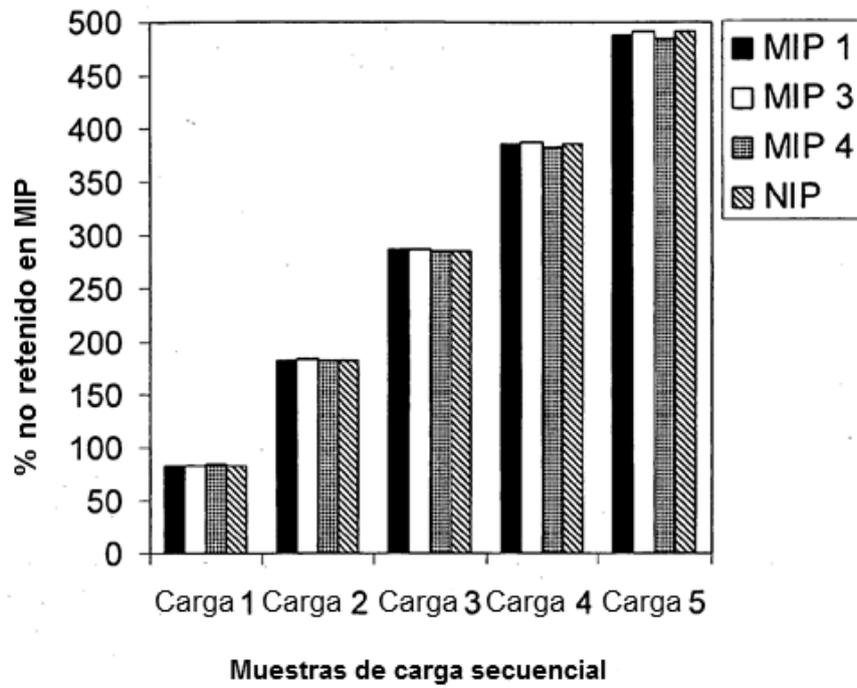


FIGURA 13

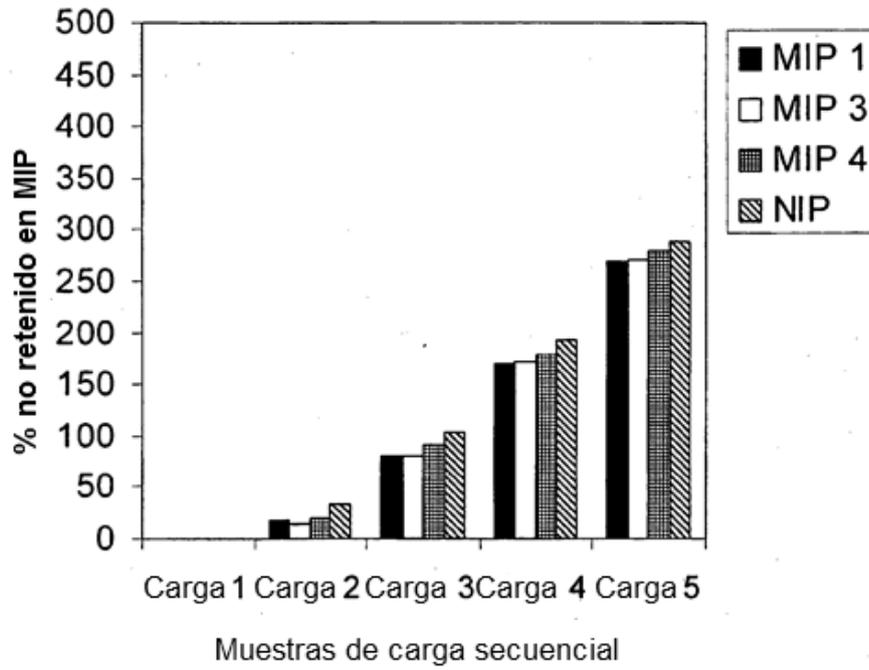


FIGURA 14

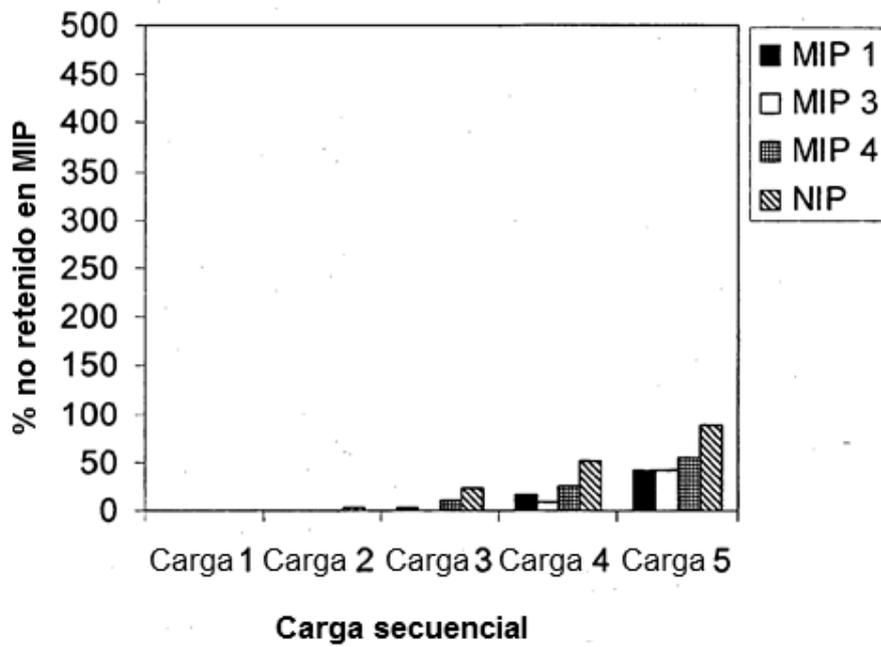


FIGURA 15

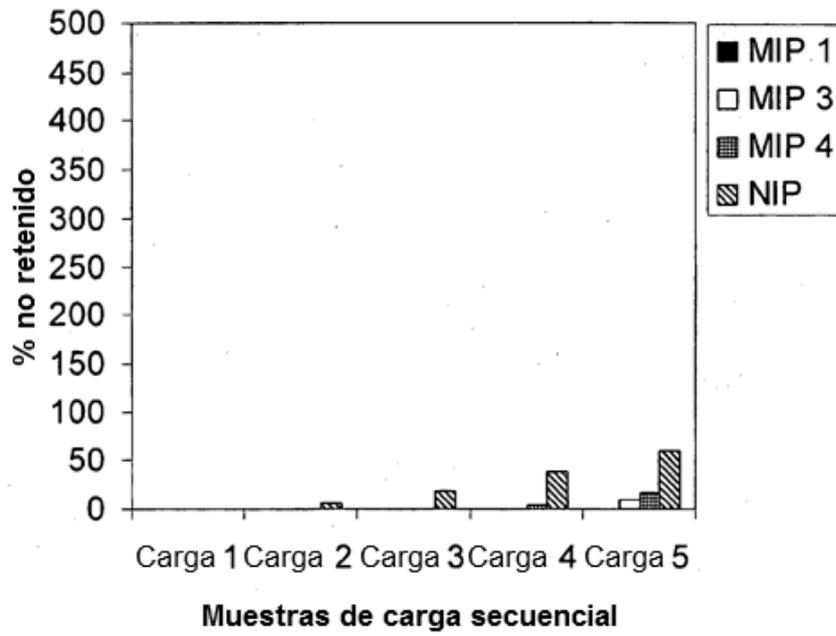


FIGURA 16

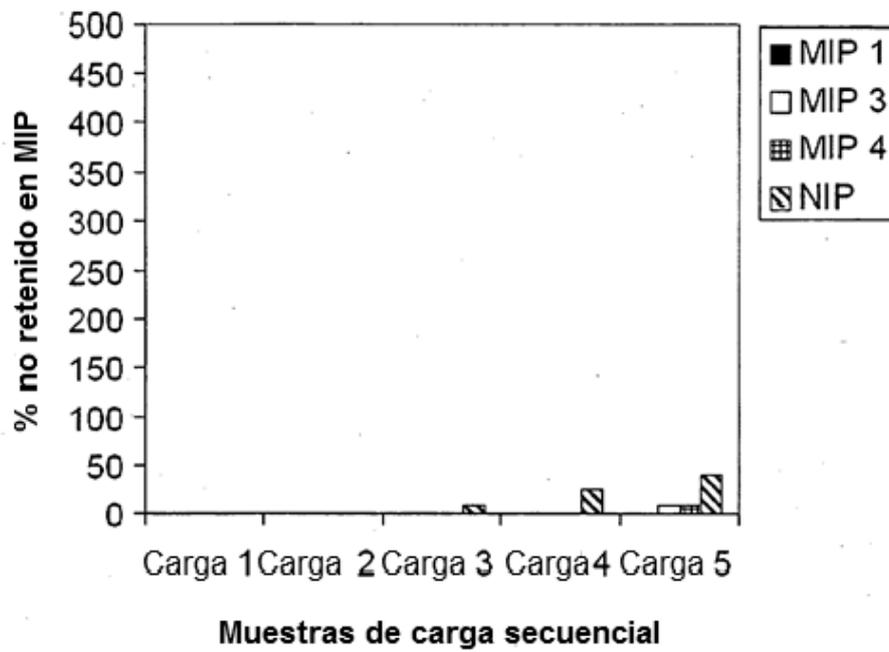


FIGURA 17

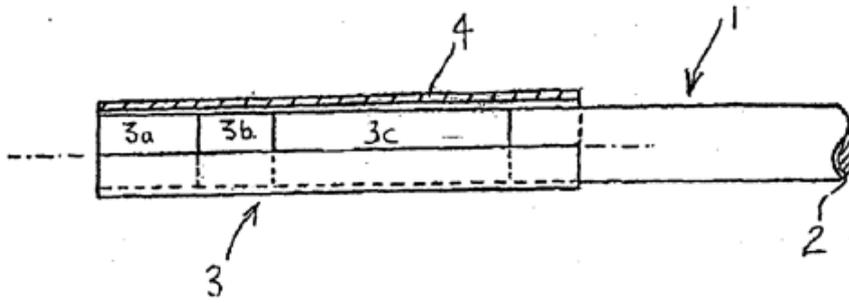


FIGURA 18

